

408 30

Ladungsgruppen im Muskeleiweiß und ihre Veränderung bei der
Hitzedenaturierung

Reiner H a m m

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Fleisch-
forschung, Kulmbach und Institut für Ernährungswissenschaft
der Universität Gießen

Frühere Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen pE-Wert und Wasserbindungsvermögen des Fleisches führten zu der Folgerung, daß der Ladungszustand der strukturellen Muskelproteine für die kolloidchemischen Eigenschaften des Gewebes und damit auch für die Fleischqualität von entscheidender Bedeutung ist (HAMM, 1962). Für ein eingehenderes Studium dieses Zusammenhanges erwies es sich als notwendig, eine Methode zur raschen, orientierenden Bestimmung der positiven und negativen Ladungen des Muskeleiweißes verfügbar zu haben. Wir wählten hierfür die Farbstoffbindungs-Methode von FRAENKEL-CONRAT und COOPER (1944). Bei diesem Verfahren wird die Summe der basischen Gruppen (ϵ -Amino-, Guanidino-, Imidazol- und endständige α -Amino-Gruppen) auf Grund der Bindung des sauren Farbstoffs Orange G bei pH 2,2 und die Summe der sauren Gruppen (Carboxyl-, Tyrosyl- und Sulfhydryl-Gruppen) auf Grund der Bindung des basischen Farbstoffs Safranin bei pH 11,5 bestimmt. Diese Methode scheint uns für Arbeiten über die Beziehung zwischen Proteinladung und dem kolloidchemischen Verhalten des Fleisches besser geeignet zu sein als das übliche Titrationsverfahren. Wie unten noch gezeigt werden soll, läßt sich die Wechselwirkung zwischen Ladungsgruppen mit der Farbstoffbindungs-Methode erkennen; mit der bei der Titration maßgebenden Protonen-Bindung ist dies nicht möglich.

CONNELL (1957) war der erste, der die Methode von FRAENKEL-CONRAT und COOPER auf tierisches Gewebe, und zwar auf Fischmuskel, anwandte. HAMM und DEATHERAGE (1960) und nach ihnen noch andere Autoren bedienten sich dieses Verfahrens zur Bestimmung der Ladungsgruppen in Warablütergewebe. Da jedoch eine gründliche Prüfung der Reaktionsbedingungen noch ausstand, mußten wir zunächst eine solche Untersuchung durchführen. Wir stellten fest, daß bei Einsatz von 5 mg Protein bzw. 25 mg Gewebe und 10 ml Farbstofflösung eine Reaktionsdauer von 18 Stunden (Schütteln bei + 5° C) genügt und daß die angewendeten Konzentrationen an Safranin (45,6 Mol/10⁴ Liter) und an Orange G (17,8 Mol/10⁴ Liter) zur Erzielung des Sättigungs-Gleichgewichtes ausreichen.

IXth CONFERENCE OF EUROPEAN MEAT RESEARCH WORKERS
Budapest, September 4-11, 1963

Der Verlauf der Farbstoffaufnahme durch die basischen und sauren Gruppen des Eiweißes folgt im Gesamtgewebe wie in Myofibrillen der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme und der kinetisch abgeleiteten Langmuir'schen Adsorptionsisotherme. Die elektrostatische Bindung der Farbstoff-Ionen dürfte in ihrem Verlauf vorwiegend durch statistische Faktoren bestimmt sein.

Im *M. longissimus dorsi* von 30 Rindern, in 25 aus dem *Longissimus dorsi*-Muskel hergestellten Myofibrillen-Präparaten und in 6 aus Rinder-Myofibrillen gewonnenen Actomyosin-Präparaten wurden die Gesamtmengen an basischen und sauren Gruppen mittels der Farbstoffbindungs-Methode bestimmt (Tabelle 1).

Myofibrillen ^{und} im Gesamtgewebe unterscheiden sich hinsichtlich der Zahl ihrer Protein-Ladungsgruppen nicht signifikant. Dagegen ist der Befund, daß das Muskeleiweiß mehr saure als basische Gruppen enthält, für Gewebe, Myofibrillen und Actomyosin statistisch hoch gesichert. Je höher der Gehalt des Eiweißes an sauren Gruppen ist, um so größer ist auch die für das elektrochemische Verhalten des Eiweißes wichtige Differenz zwischen sauren und basischen Gruppen.

Von besonderem Interesse ist ein Vergleich unserer Farbstoffbindungs-Resultate mit den für Muskelproteine und Fibrillen gefundenen Daten der Titration und der Aminosäureanalyse (Tabelle 1). In der Größenordnung stimmen unsere Ergebnisse gut mit den Werten überein, die sich aus dem Gehalt des Actomyosins an basischen und sauren Aminosäuren ergeben. Mit der Farbstoffbindungsmethode erhält man für Myofibrillen eine größere Zahl an sauren Gruppen als mit der Titrationsmethode, da bei letzterer nur die Carboxylgruppen, nicht aber die Sulfhydryl- und Tyrosyl-Gruppen erfaßt werden. Daß Myofibrillen im Mittel etwas weniger Ladungsgruppen enthalten, als es die Aminosäureanalyse von Actomyosin erwarten läßt, kann auf dem Gehalt an Bindegewebe (vor allem Kollagen) beruhen, welches verhältnismäßig arm an Ladungsgruppen ist (Tabelle 1). Die mit der Farbstoffbindungsmethode in Actomyosin gefundene Menge an Ladungsgruppen ist etwas höher als es der Aminosäureanalyse entspricht. Eine Aussage über die Signifikanz dieses Unterschiedes läßt sich jedoch wegen der geringen Zahl von Werten (6 Proben) nicht machen. Möglicherweise könnte ein Gehalt an Tropomyosin zu einer Vermehrung der Ladungsgruppen beitragen (Tabelle 1). Es sei jedoch nachdrücklich darauf hingewiesen, daß sowohl bei Gewebe wie bei Myofibrillen die Differenz zwischen den gefundenen Maximal- und Minimalwerten so groß ist

Tabella 1. Basische und saure Gruppen in Muskelproteinen und Geweben
 Vergleich zwischen den aus Farbstoffbindung, Titration
 und Aminosäure-Analyse erhaltenen Daten

SAURE GRUPPEN (g-Äquival./10⁴g Protein)

	Aminosäure-Analyse *)	Titration	Farbstoffbindung
	Carboxyl- Tyrosyl- Sulfhydryl- } Gruppen		
Myosin	18,1	16,5 **)	
Actin	16,6		
Actomyosin	17,4 (berechnet)		19,2 (+2,0)
Myofibrillen		15,3 ***)	16,6 (s=3,2) Max.:21,2 Min.:10,7
Gesamtgewebe			14,8 (s=2,5) Max.:21,2 Min.: 9,0
Tropomyosin	25,7		
Collagen	8,2		

BASISCHE GRUPPEN (g-Äquival./10⁴g Protein)

	Aminosäure-Analyse *)	Titration	Farbstoffbindung
	ε-amino- Guanidino- Imidazol- } Gruppen		
Myosin	14,1	13,4 **)	
Actin	10,9		
Actomyosin	13,0 (berechnet)		15,7 (+3,0)
Myofibrillen			11,4 (s=3,2) Max.:19,2 Min.: 7,3
Gesamtgewebe			12,6 (s=1,6) Max.:17,3 Min.: 9,6
Tropomyosin	15,7		
Collagen	8,5		

*) KOMINZ, 1954;

***) MIHALYI, 1950;

****) BENDALL u. WISMER-PEDERSEN, 1962

(Tabelle 1), daß diese Unterschiede nicht mit Schwankungen im Bindegewebs- und Tropomyosingehalt zu erklären sind. Es muß sich hier um große Unterschiede im Gehalt des Actomyosins an farbstoffbindenden basischen und sauren Gruppen handeln. Wir haben schon früher anlässlich von Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit des Wasserbindungsvermögens solche Ladungsunterschiede vermutet (HAMM, 1962) und sind gegenwärtig dabei, die Beziehung zwischen farbstoffbindenden Ladungsgruppen und Fleischqualität auf statistischer Basis zu studieren.

Bei pH 2,2 liegen alle basischen, bei pH 11,5 alle sauren Gruppen in dissoziierter Form vor. Obwohl sich zwischen pH 2,5 und 5,5 die Dissoziation der basischen Gruppen nicht ändert, sinkt die Anzahl der Orange G-bindenden, basischen Gruppen in diesem Bereich mit steigendem pH-Wert stark ab (Abb.1). Bei pH-Werten $\geq 6,0$ vermögen Myofibrillen und Gewebe kein Orange G mehr zu binden. Die stärkste Abnahme des Farbstoffbindungsvermögens fällt in den pH-Bereich, in welchem der p_K' -Wert der Carboxylgruppen liegt. Dies bedeutet, daß mit zunehmender Dissoziation der Carboxylgruppen das Farbstoffbindungsvermögen der dissoziierten basischen Gruppen abnimmt. Die Tatsache, daß bei pH-Werten > 3 auch bei maximaler Farbstoffkonzentration und 18 h Reaktionsdauer noch kein Sättigungsgleichgewicht erreicht ist, spricht dafür, daß die basischen Gruppen nicht etwa verschwinden oder völlig blockiert sind, sondern daß die Gleichgewichtskonstante der Reaktion zwischen basischen Gruppen und Orange G mit steigendem pH-Wert stark abnimmt.

Bei der Safranin-Bindung liegen die Verhältnisse analog (Abb. 1). Das Bindungsvermögen von Myofibrillen und Gewebe für diesen Farbstoff nimmt mit sinkendem pH-Wert ab. Die erste starke Abnahme der Farbstoffbindung fällt in den pH-Bereich, in welchem der p_K' -Wert der ξ -Aminogruppen des Lysins liegt (zwischen pH 10,5 und 9). Im pH-Bereich zwischen 9 und 7, in welchem keine Änderung in der Dissoziation von Ladungsgruppen eintreten kann^{*)}, ist die Änderung der Farbstoffbindung nur gering. Zwischen pH 6,5 und 5 hingegen nimmt die Safraninbindung stark ab. In diesem pH-Bereich liegt der p_K' -Wert des Histidins. Mit zunehmender Zahl an dissoziierten basischen Gruppen nimmt somit das Safranin-Bindungsvermögen der dissoziierten sauren Gruppen ab. Das Histidin ist dabei von besonderer Bedeutung, da durch Dissoziation von einer Imidazol-Gruppe die Farbstoffbindung von drei sauren Gruppen unterbunden wird. Die Abnahme der Safraninbindung durch Senkung des

^{*)} Mit Ausnahme der nur in sehr geringer Menge vorliegenden endständigen α -Aminogruppen

pH-Wertes von 11 auf 9 kann zu einem Teil auch darauf beruhen, daß die negativ geladenen Hydroxylgruppen des Tyrosins und Sulfhydryl-Gruppen des Cysteins in den undissoziierten Zustand übergehen. Bei pH-Werten ≤ 5 wird kein Safranin mehr gebunden.

Aus diesen Resultaten ist zu folgern, daß im Muskeleiweiß solche Seitengruppen, deren Ladungen durch entgegengesetzte Ladungen kompensiert werden, keine Farbstoff-Ionen zu binden vermögen und daß daher die Farbstoffbindungs-methode eine ungefähre Ermittlung der Nettoladung des Muskeleiweißes ermöglicht. Der pH-Wert, an welchem die Summe von gebundenen Farbstoff-Anionen und -Kationen ihr Minimum aufweist (pH 5,5), entspricht recht genau dem isoelektrischen Punkt (I.P.) des Actomyosins. Zu ähnlichen Vorstellungen kamen KLOTZ und URQUHART (1949) auf Grund der Bindung von Methylorange-Anionen durch Proteine. Das starke Bindungsvermögen gewisser Proteine (z.B. Rinderserumalbumin) für Methylorange auch bei pH-Werten ≥ 6 erklärten diese Autoren mit der Möglichkeit, daß bei solchen Proteinen ein Teil der Carboxylgruppen durch Wasserstoffbrücken mit OH-Gruppen von Hydroxyaminosäuren verknüpft ist; diese Carboxylgruppen sollen dann nicht mehr in Wechselwirkung mit basischen Gruppen stehen und daher soll ein solches Protein ein stärkeres Bindungsvermögen für saure Farbstoffe haben als andere Proteine mit der gleichen Zahl von basischen Gruppen. Wenn diese Überlegungen richtig sind, so muß aus dem mangelnden Bindungsvermögen für Orange G bei pH-Werten ≥ 6 gefolgert werden, daß im nativen Actomyosin Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Carboxylgruppen und Hydroxyaminosäuren nicht in nennenswertem Umfange vorliegen.

Hinsichtlich ihrer pH-Abhängigkeit bestehen zwischen Farbstoffbindungsvermögen und Wasserbindungsvermögen bemerkenswerte Analogien. Dies gilt z.B. für das Bindungs-Minimum bei pH 5 und für den stufenförmigen Verlauf des Bindungsvermögens auf der basischen Seite des I.P. Diese Analogien sind eine Bestätigung unserer Vorstellung über die Bedeutung der Proteinladung für die Fleischqualität, doch würde eine Diskussion dieses Zusammenhanges über den Rahmen dieses Vortrages hinausgehen.

Die Farbstoffbindungs-Methode zur Bestimmung der Ladungsgruppen im Muskel-eiweiß wurde nun auf das Studium der Hitzedenaturierung des Fleisches angewendet. Wie wir schon früher gefunden hatten (HAMM u. DEATHERAGE, 1960), nimmt bei Erhitzen des Muskelgewebes auf 70° C die Zahl der sauren, Safranin bindenden Eiweiß-Gruppen ab, während die Menge an basischen, Orange G bindenden

413

Gruppen unverändert bleibt. Mit dieser Reaktion konnten wir die Zunahme des pH-Wertes, die Verschiebung des I.P. zu höheren pH-Werten, die Abnahme der Kationenbindung und die charakteristische Art der Wasserbindungs-Änderung erklären. Wir stellten nun fest, daß es auch beim Erhitzen von Myofibrillen und von Actomyosin auf 70° C zu einer Abnahme an farbstoffbindenden sauren Gruppen (bis zu 55 % der ursprünglich vorhandenen Gruppen) kommt (Abb. 2). Je mehr saure Gruppen im nativen Protein vorhanden sind, um so stärker ist ihre Abnahme bei Hitze-denaturierung. Wir fanden ferner, daß durch Erhitzen von 70° C auf 120° C die Zahl der sauren Gruppen weiter abnimmt (Abb. 2). Als weiterer neuer Befund ergab sich schließlich, daß in Gesamtgewebe und in Myofibrillen bei Erhitzen von 70° C auf 120° C auch die basischen Gruppen abnehmen (maximal um 20 % der ursprünglichen Menge). Bei Actomyosin ist die Abnahme an basischen Gruppen durch Erhitzen auf 120° C nur gering.

Bei der Änderung der Farbstoffbindung durch Erhitzen handelt es sich offenbar um eine völlige Blockierung von Ladungsgruppen und nicht etwa nur um eine Verminderung der Gleichgewichtskonstanten, da die Farbstoffkonzentration, bei welcher das Protein mit Farbstoff gesättigt ist, in erhitzten Myofibrillen etwa die gleiche ist wie in nativen (Abb. 3). Die Abnahme von sauren Gruppen durch Erhitzen auf 70° C kann jedoch nicht auf einer Zerstörung dieser Gruppen - z.B. durch Decarboxylierung - beruhen, da nach allen Angaben der Literatur der Aminosäuregehalt des Fleisches durch Erhitzen auf diese Temperatur nicht herabgesetzt wird. Die sauren Gruppen des Muskeleiweißes müssen daher so gebunden sein, daß sie durch Säurehydrolyse wieder freigesetzt werden. Man wird eine Wechselwirkung mit anderen Gruppen annehmen müssen, welche - etwa durch Bildung von Wasserstoffbindungen - die Bindung von Safranin-Ionen auch bei pH 11,5 verhindert. Eine Wechselwirkung mit basischen Gruppen dürfte nicht in Betracht kommen, da Erhitzen auf 70° C die Bindung von Orange G nicht nur bei pH 2,2, sondern auch bei pH 3,6 und 5,0 unbeeinflusst läßt (Abb. 4). Diese Kurven gestatten noch einen weiteren Schluß: Die sauren Gruppen, welche durch Erhitzen ihr Farbstoffbindungsvermögen verlieren, können bei dem normalen pH-Wert des Muskels (pH 5,5), bei dem die Erhitzung erfolgte, nicht in elektrostatischer Wechselwirkung mit basischen Ladungsgruppen gestanden haben. Wäre dies nämlich der Fall, so müßte durch die Abnahme saurer Gruppen beim Erhitzen ein Überschuß an basischen Gruppen, d.h. eine Zunahme der Bindung von Orange G bei pH 5,0 eintreten. Dies aber ist nicht der Fall (Abb. 4).

Offenbar sind in isoelektrischen Muskeleiweiß bei weitem nicht alle entgegengesetzt geladenen Gruppen salzartig miteinander verknüpft. Dennoch

vermögen sie erst dann Farbstoff-Ionen zu binden, wenn die Dissoziation der entgegengesetzten Ladungsgruppen zurückgedrängt wird. Vermutlich macht die Aufhebung von salzartigen Brückenbindungen auch die nicht an der Salzbindung beteiligten Ladungsgruppen für die Farbstoff-Ionen aus sterischen Gründen zugänglich.

Diesen Ergebnissen zufolge kann die Blockierung saurer Gruppen beim Erhitzen nicht durch Reaktion mit Ladungsgruppen zustande kommen. Möglicherweise handelt es sich um die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Carboxyl- und Hydroxylgruppen. Actomyosin enthält immerhin 8,3 g-Äquivalente Hydroxyaminosäuren (Serin + Threonin) pro 10^4 g Protein. Mit der experimentellen Bearbeitung dieses Problems sind wir zur Zeit beschäftigt.

Wie wir in früheren Versuchen fanden, zeigen alle von uns untersuchten Veränderungen des Muskeleiweißes bei Hitzedenaturierung zwischen 50° und 55° C eine charakteristische Verzögerung oder Unterbrechung (HAMM u. DEATHERAGE, 1960; HAMM, 1962). Dies gilt für die Abnahme der sauren Gruppen und des Wasserbindungsvermögens in Gewebe sowie für die Zunahme des pH-Wertes und das Freiwerden von Erdalkali-Ionen. Es ergab sich nun der interessante Befund, daß bei Erhitzen von reinem Actomyosin ebenfalls zwischen 50° und 55° C eine signifikante Unterbrechung in der Abnahme farbstoffbindender saurer Gruppen eintritt (Abb. 5). In diesem Temperaturbereich, in welchem sich auch die Koagulation des Actomyosins vollzieht, kommt es sehr wahrscheinlich zu einer "Umorientierung" der Ladungsgruppen.

Wir möchten annehmen, daß die gleichen Reaktionen, welche die Abnahme von sauren Gruppen bedingen, auch für die Koagulation verantwortlich sind, zumal es sich nachweisen läßt, daß die Koagulation und die damit verbundene feste Vernetzung der Proteinstruktur nicht auf der Bildung neuer Disulfidbrückenbindungen beruht. Erhitzen auf 70° C führt nämlich weder bei Myofibrillen noch bei Actomyosin zu einer Abnahme an Sulfhydrylgruppen (Abb. 6). Die Zugänglichkeit der Sulfhydrylgruppen für N-Äthylmaleinimid, die wesentlich geringer ist als die Zugänglichkeit für die bedeutend kleineren Ag^+ -Ionen, nimmt sogar durch Erhitzen der Myofibrillen von 30° C auf 70° C zu, wie dies auch bei vielen anderen Proteinen der Fall ist.

Abschließend noch eine Bemerkung zur Abnahme von farbstoffbindenden basischen Gruppen beim Erhitzen. Diese Reaktion setzt erst bei Temperaturen ein, bei denen auch Bräunungsreaktionen im Fleisch beginnen. Es ist möglich, daß das Verschwinden basischer Gruppen auf der Kondensation von

Aminogruppen des Eiweißes mit Carbonylgruppen entsprechend dem Typus der Maillard-Reaktion beruht. An dieser Reaktion können jedoch die löslichen Kohlenhydrate des Muskelplasmas nicht als Carbonylkomponente beteiligt sein, da hinsichtlich der Abnahme an basischen Gruppen durch Erhitzen auf 120° C zwischen Gesamtgewebe und Myofibrillen kein signifikanter Unterschied besteht.

Zusammenfassung

Die basischen und sauren Gruppen im Eiweiß von Muskelgewebe, Myofibrillen und Actomyosin (Rind) wurden mittels einer Farbstoffbindungs-Methode bestimmt. Die so erhaltenen Mittelwerte stimmen mit den Werten gut überein, welche sich aus der Aminosäure-Analyse von Actin und Myosin ergeben.

Wie die pH-Abhängigkeit der Farbstoffbindung zeigt, vermögen nur solche Ladungen des Muskeleiweißes Farbstoff-Ionen zu binden, welche nicht durch entgegengesetzte Ladungen kompensiert sind. Die Farbstoffbindungs-Methode gestattet es daher, die ungefähre Nettoladung des Eiweißes und die Lage des isoelektrischen Punktes zu ermitteln. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Carboxylgruppen und Hydroxylgruppen von Protein-Seitenketten scheinen im nativen Muskeleiweiß nicht in nennenswerten Umfang vorzuliegen.

Durch Erhitzen auf 70° C nimmt in Muskelgewebe, Myofibrillen und Actomyosin die Zahl der sauren Gruppen ab, während die Menge an basischen Gruppen unverändert bleibt. Beim Erhitzen von 70° C auf 120° C kommt es zu einer weiteren Abnahme an sauren Gruppen und außerdem zu einer Abnahme an basischen Gruppen. Wie der Einfluß der Hitzedenaturierung auf das Farbstoffbindungsvermögen basischer Gruppen bei verschiedenen pH-Werten ergab, kommt die Blockierung saurer Gruppen beim Erhitzen nicht durch Reaktion mit Ladungsgruppen zustande. Die Möglichkeit der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Carboxyl- und Hydroxylgruppen wird diskutiert.

Denaturierungsversuche lassen ferner erkennen, daß in nativen, isoelektrischen Eiweiß bei weitem nicht alle entgegengesetzt geladenen Gruppen salzartig miteinander verknüpft sind.

Beim Erhitzen von Actomyosin tritt - ganz analog wie in Gewebe - zwischen 50° und 55° C in der Abnahme der farbstoffbindenden sauren Gruppen eine charakteristische Stufe ein, die wahrscheinlich auf einer "Umorientierung" von Ladungsgruppen beruht.

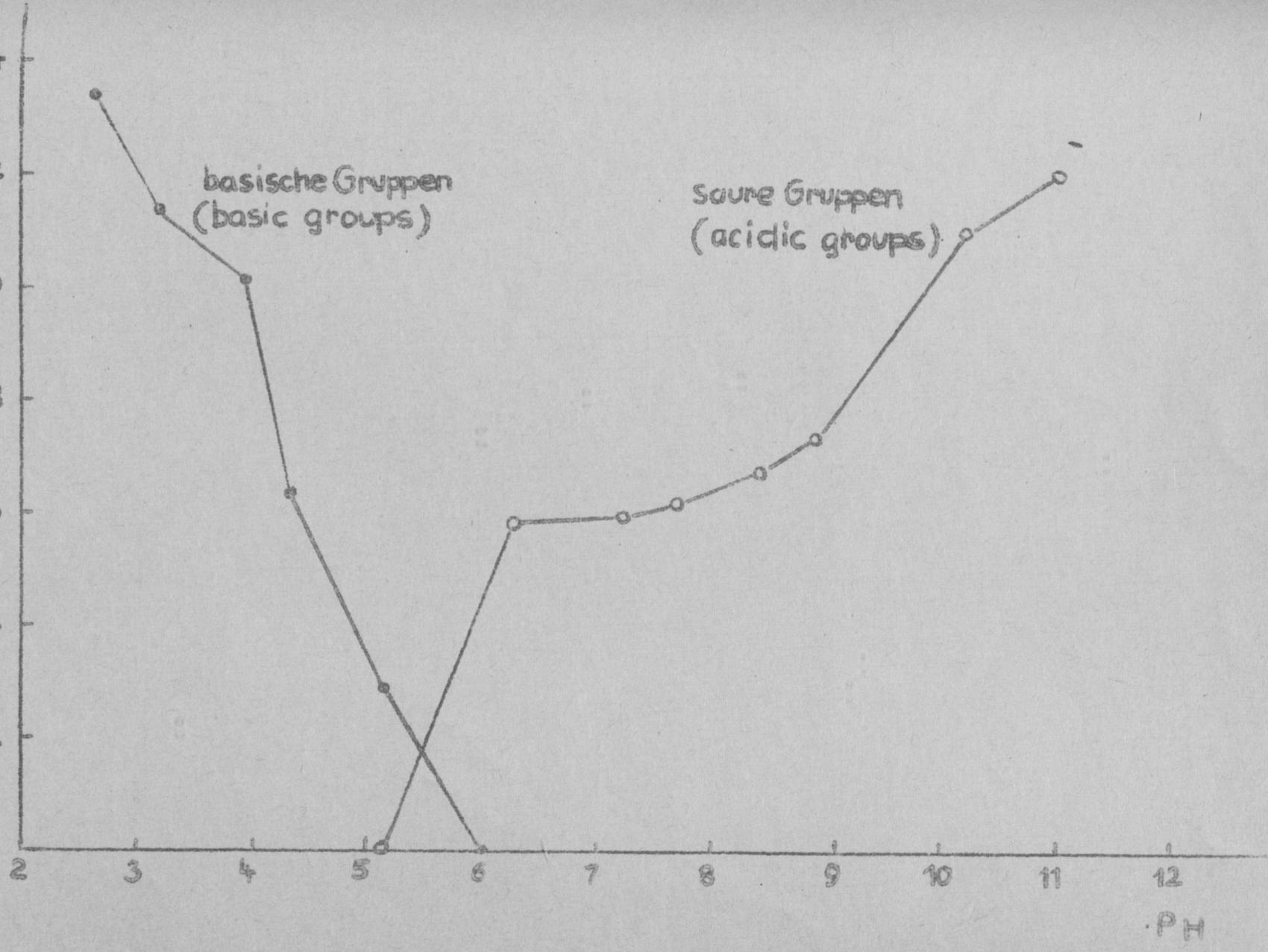
Es wurde nachgewiesen, daß bei der Hitzekoagulation von Myofibrillen und Actomyosin keine neuen Disulfid-Brückenbindungen gebildet werden.

An der Reaktion, welche beim Erhitzen des Gewebes auf 120° C zur Abnahme von basischen Gruppen führt, sind die löslichen Kohlenhydrate des Sarkoplasmas nicht entscheidend beteiligt.

Abb.: 1

g-Äquival. farbstoffbindende Gruppen pro 10⁴g Protein

[g equivalents dye-binding groups per 10⁴g protein]



t. 12

Abb. 2

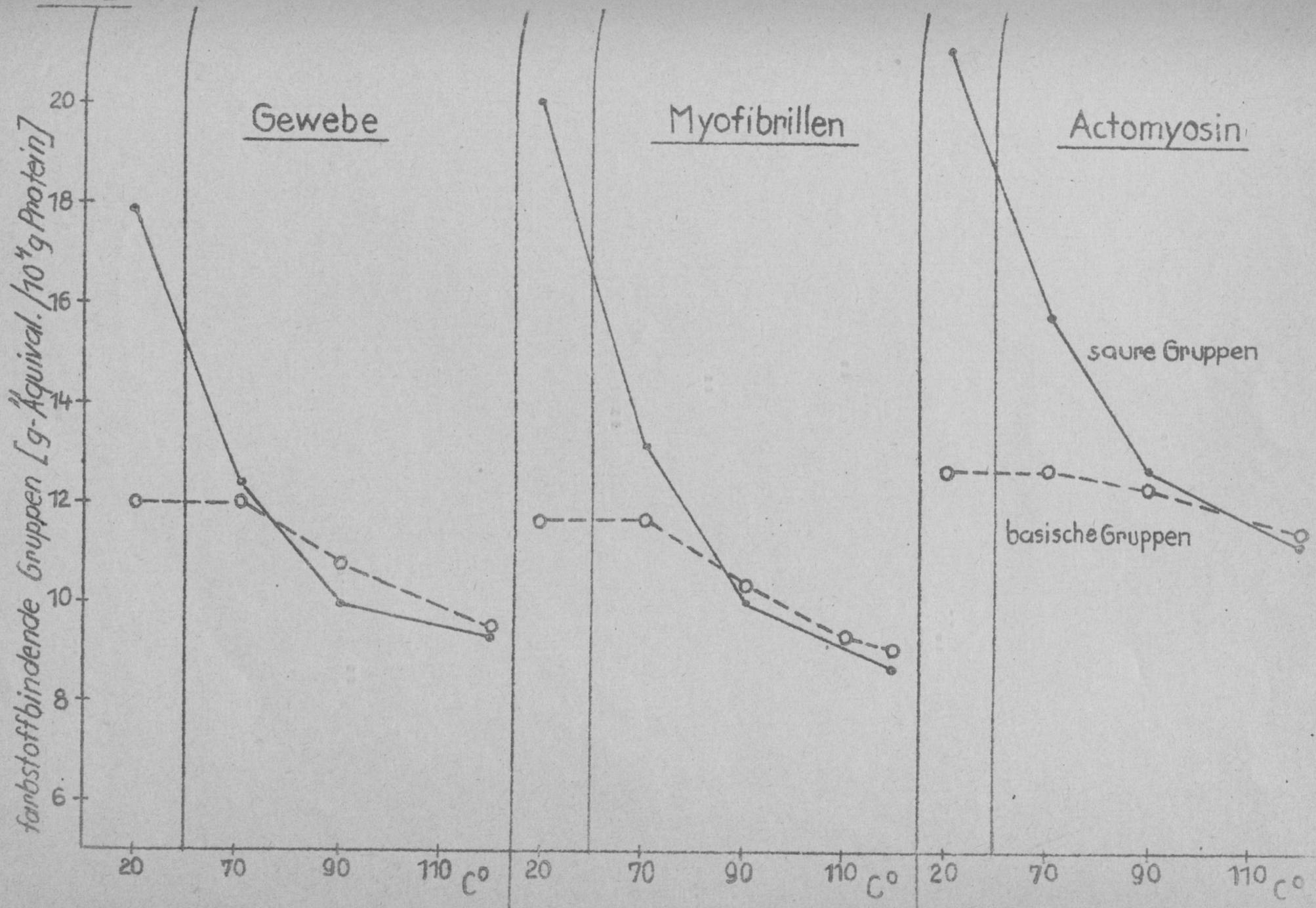


Abb. 3

Myofibrillen

(myofibrils)

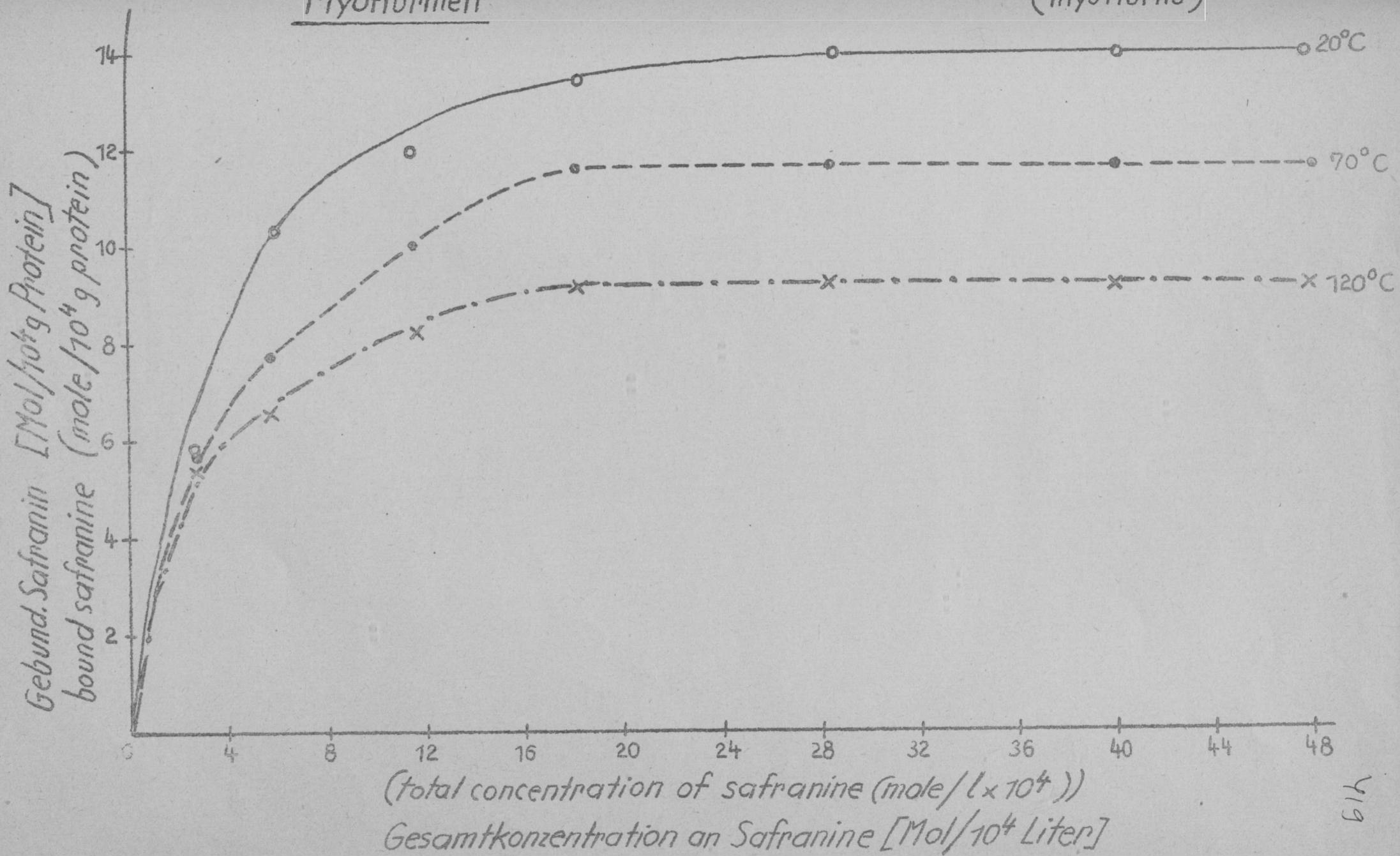


Abb. 4

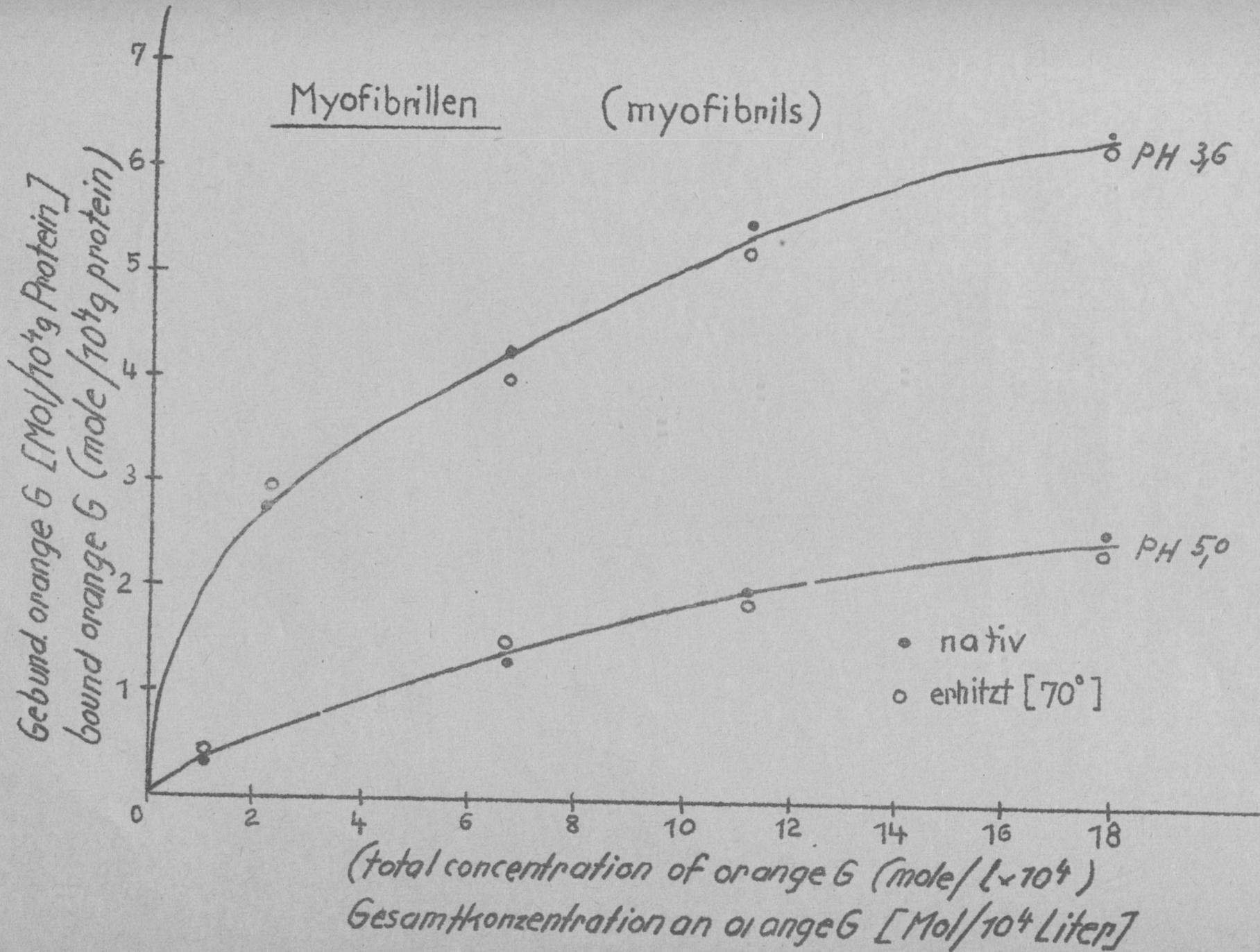


Abb. 5

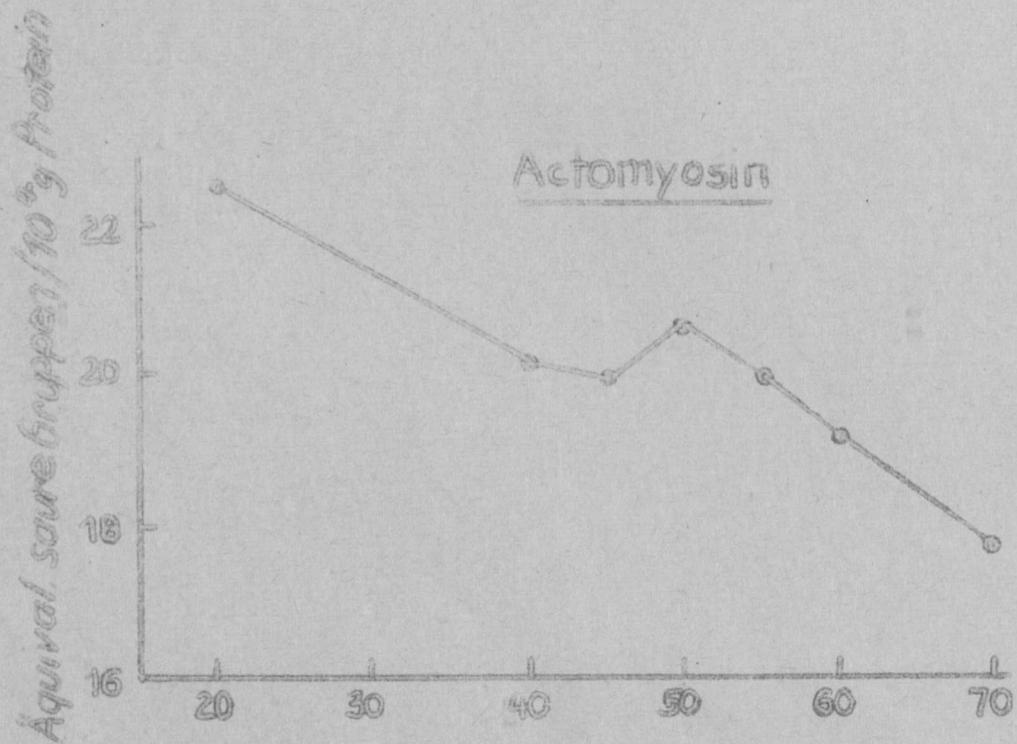


Abb. 6

