

Sulphydryl- und Disulfidgruppen des Fleisches und ihre Bestimmung

K. Hofmann und R. Hamm, Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

1. Einleitung

Die Erforschung der Rolle der Sulphydryl (SH)- und Disulfid (SS)-gruppen in der Proteinchemie rückt im Rahmen der Fleischforschung immer mehr in den Vordergrund des Interesses. Die SH-Gruppen sind die reaktionsfähigsten funktionellen Gruppen der Proteine überhaupt und stehen daher in Beziehung zu zahlreichen Veränderungen des Fleisches. Die Bestimmung der SH-Gruppen stößt jedoch auf einige prinzipielle Schwierigkeiten. Die Bedeutung der SH-Gruppen für die Funktion der Proteine ist in vielen Fällen noch nicht geklärt. S. Rapoport schreibt daher völlig zu recht (1): "Die Biochemie der SH-Gruppe ist eines der merkwürdigsten Kapitel der Geschichte der Wissenschaft". Wir hatten in den vergangenen fünf Jahren Gelegenheit, uns dem Studium der SH- und SS-Gruppenbestimmung zu widmen und einige Methoden auszuarbeiten, deren Prinzip nachstehend mitgeteilt wird.

2. Die Bedeutung der SH-Gruppen für die Chemie des Fleisches

Die SH-Gruppen stehen in Beziehung zu verschiedenen Veränderungen des Fleisches während seiner Lagerung (2) und Verarbeitung, insbesondere bei der Fleischreifung (3,4), beim Gefrieren (5,6), Pökeln (7-9) und Räuchern (10). Auch für die Bindung von ATP (energiereichem Phosphat) an das Muskelprotein Myosin, für die Aktivität von ATPase, die Polymerisation von Actin und für die Muskelkontraktion sind die SH-Gruppen des Muskels von Bedeutung. weiterhin wird die Qualität des Fleisches, wie etwa die Zartheit (2, 11, 12) und das Wasserbindungsvermögen, durch das SH- und SS-System der Muskelproteine und dessen Reaktionen beeinflusst.

Beim Erhitzen von Fleisch wird zum Teil aus den SH-Gruppen des Muskeleiweißes (14, 13) Schwefelwasserstoff abgespalten (15-18), der beim Eindosen von Fleisch eine Korrosion (an der Schwarzung erkennbar) des Dosenmaterials

(15) verursacht, während ein anderer Teil der SH-Gruppen unter dem Einfluß von Sauerstoff zu Disulfidgruppen oxydiert wird (13, 14).

Ernährungsphysiologisch interessant ist die partielle Zerstörung der den SH- und SS-Gruppen zugrundeliegenden Aminosäuren Cystin und Cystein bei einer langdauernden Hochehitze von Muskeleiweiß (13), was eine Abnahme seines Nährwertes zur Folge hat (die schwefelhaltigen Aminosäuren begrenzen den Nährwert von Fleischeiweiß).

Die SH-Gruppen der meisten Proteine besitzen eine unterschiedliche Reaktionsfähigkeit, die sich mit dem Zustand eines Proteins ändern kann. Im Eialbumin z. B. sind die SH-Gruppen erst nach Denaturierung (Harnstoff, Hitzewirkung) nachweisbar. In manchen Fällen bieten daher SH-Gruppenbestimmungen auch die Möglichkeit, Denaturierungsvorgänge zu verfolgen.

Aber trotz aller bisher erzielten Fortschritte auf den genannten Gebieten sind unsere Kenntnisse über die Beziehungen zwischen den SH- bzw. SS-Gruppen und den verschiedenen Veränderungen des Fleisches noch sehr lückenhaft. Es handelt sich hier um ein erfolgversprechendes und reizvolles Arbeitsgebiet der Fleischforschung, das bisher nur wenig betreten wurde und bei dem es noch vieler Anstrengungen von verschiedenen Seiten bedarf, bis es in allen seinen Teilen gründlich bearbeitet sein wird.

3. Allgemeine Schwierigkeiten bei der Bestimmung von Protein-SH-Gruppen

Es bereitet vielfach Schwierigkeiten, die SH-Gruppen eines Proteins vollständig zu erfassen. Dies liegt in dem räumlichen Bau der nativen Proteine begründet. Nach den bisherigen Erfahrungen unterscheidet man a) freie SH-Gruppen, die rasch reagieren (wie etwa in den einfachen SH-Verbindungen Cystein und Glutathion), b) träge reagierende SH-Gruppen und c) maskierte - im nativen Zustand eines Proteins nicht reagierende - SH-Gruppen. Es ist leicht zu verstehen, daß die SH-Gruppen in den kompliziert gebauten Riesenmolekülen der Proteine nicht so leicht von einem Reagens erfaßt werden können wie in einer nieder-

molekularen Verbindung. Über die Ursache der Nichtzugänglichkeit mancher SH-Gruppen (der "maskierten" SH-Gruppen) existieren mehrere verschiedene Theorien, die hier nicht erörtert werden sollen. Die Reaktionsfähigkeit der Protein-SH-Gruppen kann natürlich nicht unabhängig von dem angewendeten Reagens betrachtet werden, von dessen Natur das Ergebnis einer SH-Gruppenbestimmung in starkem Maße abhängen kann. Die folgende Zusammenstellung zeigt am Beispiel des Eialbumins sehr deutlich, wie unterschiedlich teilweise die erzielten Ergebnisse bei Anwendung verschiedener Reagentien sind.

Tabelle SH-Gehalt in durch Harnstoff denaturiertem Eialbumin

Reagens	Art der Reaktion	Mol SH Mol Protein	Lit.
Kaliumferricyanid	Oxydation	2,3	19
Jodacetat	Alkylierung	3,3	21
Porphyridin	Oxydation	3,8	22
Silbernitrat	Mercaptidbildung	4,3	23
p-Chlormercuribenzoat	Mercaptidbildung	5,5	19

Weiterhin von Einfluß auf die Bestimmung von Protein-SH-Gruppen sind im allgemeinen auch die Reaktionsbedingungen (Temperatur und Zeit). Eine einwandfreie SH-Gruppenbestimmung setzt voraus, daß das zugesetzte Reagens so lange einwirkt, bis Reaktionsgleichgewicht erreicht ist. Bei der Anwendung direkter Titrationsverfahren, die wegen ihrer raschen Durchführbarkeit heute bevorzugt angewendet werden, ist es zweifelhaft, ob diese Bedingung auch immer erfüllt wird.

4. Nachweis von SH-Gruppen im Muskeleiweiß

Hierfür wird gewöhnlich der Tüpfeltest mit Nitroprussidnatrium und Ammoniak (13) angewendet, der eine Rotviolett-färbung ergibt. Diese Reaktion ist außerordentlich empfindlich, aber nicht sehr stabil. Durch Zusatz von Kalium-

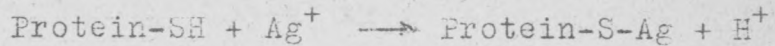
cyanid läßt sich die Farbe etwas stabilisieren. Da Cyanid Disulfidgruppen unter Bildung von SH-Gruppen zu spalten vermag, darf es allerdings nur in starker Verdünnung angewendet werden. Nach unseren Untersuchungen kann man statt Ammoniak vorteilhaft eine Lösung von Zinkchlorid verwenden (24). A. Giroud und H. Bulliard (25) haben diese Reaktion bereits zum Anfarben von Gewebeschnitten angewendet, aber erst in letzter Zeit hat man die Reaktion von Nitroprussidnatrium und Zinkchlorid mit zahlreichen verschiedenen SH-Verbindungen näher untersucht (24, 26). Mit Lyofibrillen und anderen SH-Proteinen erhält man eine sehr stabile Rosafärbung. Für Untersuchungen, bei denen es auf eine ungefähre Abschätzung eingetretener Unterschiede im SH-Gruppengehalt ankommt, bietet daher diese Reaktion wesentliche Vorteile gegenüber der Anwendung von Ammoniak.

5. Bestimmung von SH-Gruppen im Fleischeiweiß

Die Auswahl der anzuwendenden Methode zur Bestimmung von SH-Gruppen richtet sich in erster Linie nach dem Ziel der beabsichtigten Untersuchungen. Will man sowohl Denaturierungsvorgänge als auch chemische Veränderungen untersuchen, so setzt dies Bestimmungsmethoden voraus, die von sich aus keine Denaturierung - die sehr leicht eintreten kann - verursachen. Eine eingehende Diskussion hierüber, die wir kürzlich veröffentlichten (27), ergab, daß für die Bestimmung von SH-Gruppen in ungelöstem Muskeleiweiß (Fleisch, Myofibrillen, Actomyosin) in erster Linie die Reaktionen mit Silbernitrat (AgNO_3), N-Äthylmaleinimid (NEM) und p-Chlormercuribenzoat (PCMB) in Betracht kommen. Bei den im folgenden beschriebenen Methoden wird das Untersuchungsmaterial mit einem geringen Reagensüberschuß versetzt und nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichts die nicht verbrauchte Reagenmenge ermittelt, woraus sich dann der Reagensverbrauch ergibt.

5. 1. Bestimmung von SH-Gruppen mit Silbernitrat

SH-Gruppen reagieren mit Silber-Ionen unter Bildung von Silbermercaptiden:



Die nach dieser Reaktion unverbrauchte Menge an Ag^+ -Ionen wird mithilfe einer einfachen amperometrischen Titration bestimmt. Die hierfür benötigte Apparatur kann leicht selbst zusammengestellt werden (13, 28). Im Prinzip ist die Apparatur ein galvanisches Element. Das Titrationsgefäß stellt die Indikatorelektrode dar. Sie ist über ein Mikroamperemeter mit einer Vergleichselektrode kurzgeschlossen (Abb. 1).

Titriert man eine SH-haltige Lösung mit Silber-Ionen, so werden diese zunächst verbraucht (s. Gleichung). In dieser Phase tritt am Meßinstrument kein Ausschlag auf. Sobald jedoch der Äquivalenzpunkt der Titration überschritten wird, treten freie Ag^+ -Ionen auf und durch das Mikroamperemeter beginnt ein Strom zu fließen, der der Ag^+ -Ionenkonzentration proportional ist. Trägt man nun die Ausschläge am Meßinstrument gegen die schrittweise zugesetzten Reagensmengen auf (Millimeterpapier), so erhält man zwei sich schneidende Geraden, deren Schnittpunkt dem Endpunkt der Titration entspricht (Abb. 2).

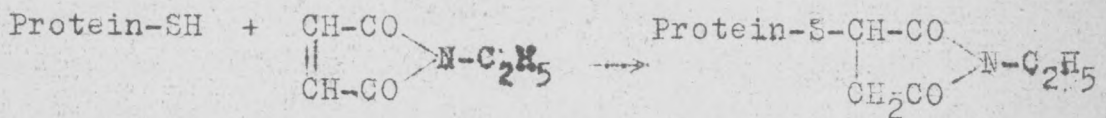
Nach der Reaktion von Muskeleiweiß mit Silbernitrat liegen im Titrationsgefäß keine SH-Gruppen, sondern freie, überschüssige Ag^+ -Ionen vor, die nun mit einer SH-Lösung titriert werden könnten, wobei man eine sog. L-Kurve erhielte. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse waren jedoch unbefriedigend. Wir wendeten daher folgenden Kunstgriff an: Zu der Lösung wird eine bestimmte Menge SH-Glutathion zugegeben, die etwas größer ist als die der Silber-Ionen. Das überschüssige SH-Glutathion läßt sich ohne Schwierigkeit titrieren, aus der Differenz zwischen dem zugesetzten und dem restlichen Glutathion erhält man die gesuchte Menge an Ag^+ -Ionen.

Mit dieser Methode werden sämtliche SH-Gruppen des Muskeleiweißes erfaßt, unabhängig davon, ob es in nativer oder denaturierter Form untersucht wird. Das Verfahren wird unter Bedingungen durchgeführt, bei denen die Anwesenheit

von Luftsauerstoff nicht stört. Um die Zuverlässigkeit dieser Methode zu überprüfen, haben wir sie auf verschiedene kristallisierte Proteine angewendet, deren SH- und SS-Gehalte aus der Literatur bekannt waren. Die Untersuchungen an Hämoglobin (enthält nur SH), Lysozym und Pepsin (nur SS), Eialbumin und Serumalbumin (SH und SS) und Cytochrom C (weder SH noch SS) ergaben in allen Fällen eine gute Übereinstimmung (30) mit den als am zuverlässigsten geltenden Angaben in der Literatur.

5. 2. Bestimmung von SH-Gruppen mit N-Athylmaleinimid

N-Athylmaleinimid (NEM) ist ein sehr gebräuchliches SH-Reagens. Es besitzt eine Doppelbindung, an welche die SH-Gruppe addiert wird:

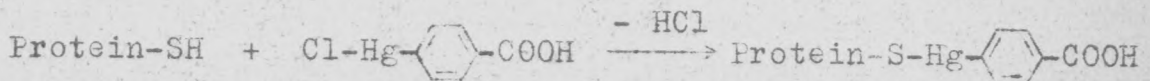


Auf Grund seiner Doppelbindung absorbiert NEM UV-Licht bei einer Wellenlänge von 300 nm. Durch Messung der Lichtabsorption bei 300 nm kann seine Konzentration gemessen und damit das Ausmaß der Reaktion mit den SH-Gruppen bestimmt werden. Mit diesem Reagens erfaßt man nicht alle, sondern nur einen Teil, nämlich die leicht zugänglichen SH-Gruppen im Fleischiweiß (13, 29). Da durch Denaturierung die vorher unzugänglichen SH-Gruppen in leichter zugängliche übergehen können, ist es möglich, durch Anwendung von NEM mit Hilfe der SH-Bestimmung Denaturierungsvorgänge beim Muskeleiweiß zu verfolgen.

5. 3. Bestimmung von SH-Gruppen mit p-Chlormercuribenzoat

Ein sehr häufig für die Bestimmung von Protein-SH-Gruppen angewendetes Reagens ist p-Chlormercuribenzoat (PCMB).

Es reagiert in folgender Weise:

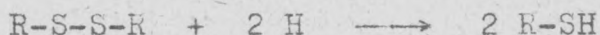


Besonders vorteilhaft ist die Anwendung von PCMB auf gelöste SH-Proteine, da das Reaktionsprodukt selber durch

Messung der Absorption bei 250 - 255 nm bestimmt werden kann. Bei den ungelösten Muskelproteinen wird statt dessen der Reagensüberschuß im Spektralphotometer bei 232 nm ermittelt. PCMB reagiert - ebenso wie NEM - nur mit einem Teil der SH-Gruppen im Muskeleiweiß. Das Ausmaß der Reaktion hängt jedoch sehr stark von der PCMB-Konzentration ab (13).

6. Bestimmung der Disulfidgruppen

Die Disulfidgruppen werden nicht als solche bestimmt, sondern durch geeignete Methoden zunächst zu SH-Gruppen reduziert. Wir verwendeten hierfür Natriumborhydrid, NaBH_4 , das eine Disulfidgruppe in zwei SH-Gruppen überführt gemäß



Man bestimmt die SH-Gruppen im reduzierten und nicht-reduzierten Material mittels der Silbernitratmethode und erhält aus der Differenz der beiden Werte den Gehalt an Disulfidgruppen.

In der Aminosäureanalyse von Proteinhydrolysaten kann man zwischen Cystein (SH) und Cystin (SS) nicht unterscheiden, da während der Hydrolyse das Cystein zu Cystin oxydiert wird. Es wird daher nur der sog. Gesamtcystingehalt (Cystein + Cystin) ermittelt. Dieses Verfahren ist aber von Natur aus fehlerhaft, da während der Hydrolyse beträchtliche Verluste an Cystin auftreten (31-33). Heute bestimmt man das Gesamtcystin meist in Form von Cysteinsäure. Mit Sicherheit jedoch werden Verluste an Cystin vermieden, wenn man die Bestimmung am intakten, nicht-hydrolysierten Protein - über eine SH-Gruppen-Analyse - durchführt.

7. Schlußbetrachtung

Die hier beschriebenen Bestimmungsmethoden wurden zur Untersuchung des Einflusses der thermischen Behandlung von Fleisch, Myofibrillen und Actomyosin auf die SH- und SS-Gruppen angewendet, deren Ergebnisse bereits veröffentlicht sind (13, 14). Folgende Beispiele für die im nativen Zustand gefundenen SH-Werte seien an dieser Stelle angeführt:

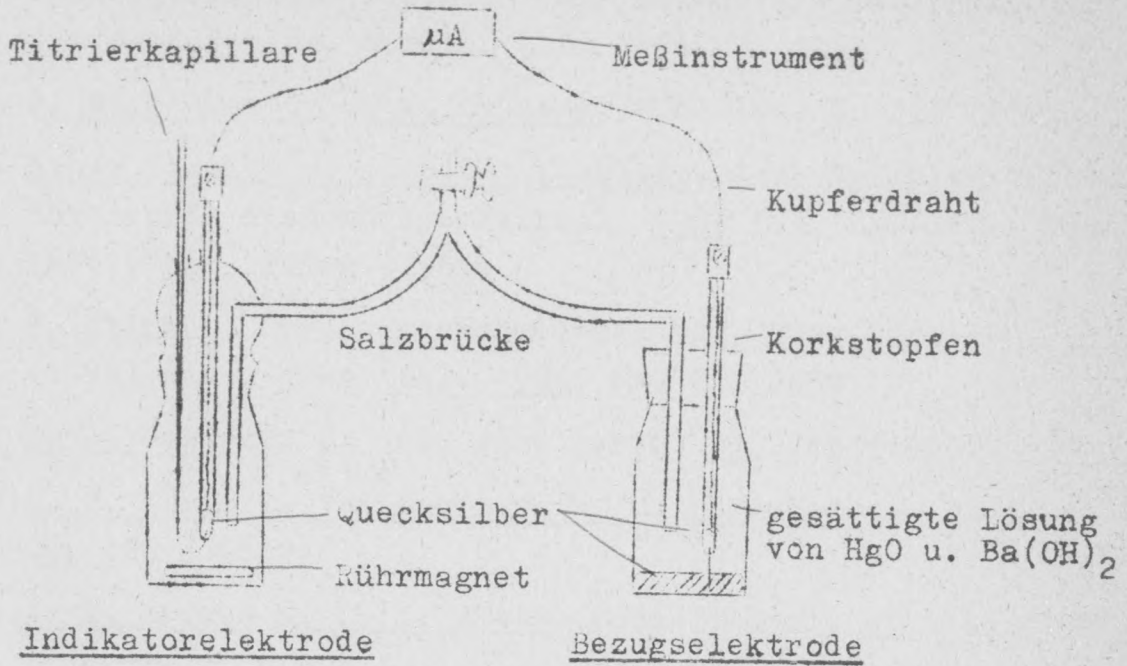
Material	Reagens	$\frac{\text{mg SH}}{\text{g Protein}}$
Gesamtgewebe	AgNO ₃	2,92
Myofibrillen	NEM	1,16 - 1,31
Myofibrillen	AgNO ₃	3,14
Actomyosin	AgNO ₃	2,91

Diese SH-Werte, die von Fleisch zu Fleisch schwanken können, stellen Mittelwerte für Muskelmaterial von verschiedenen Tieren (Rind) dar.

Zusammenfassung

Die Bedeutung der SH-Gruppen für zahlreiche Veränderungen des Fleisches ist zwar zum Teil bekannt, bisher jedoch nur in den Anfängen untersucht worden. Eine Ursache hierfür mag in den prinzipiellen Schwierigkeiten der Bestimmung von SH-Gruppen in Proteinen begründet liegen. Man unterscheidet für gewöhnlich drei Gruppen von Protein-SH-Gruppen: freie, träge reagierende und maskierte. Im Muckeleiweiß sind mit Silbernitrat alle SH-Gruppen bestimmbar, während mit N-Athylmaleinimid und p-Chlormercuribenzoat nur ein Teil der SH-Gruppen erfaßt wird. Mit N-Athylmaleinimid können Denaturierungserscheinungen untersucht werden, bei denen sich die Zugänglichkeit der SH-Gruppen ändert. Disulfidgruppen und der Gesamtcystingehalt werden ermittelt, indem man zunächst durch Reduktion mit Natriumborhydrid SS-Gruppen in SH-Gruppen überführt und diese mit der Silbernitratmethode bestimmt. Die Bestimmung der SH- und Disulfidgruppen mit Silbernitrat ist an verschiedenen kristallisierten Proteinen überprüft und als zuverlässig bestätigt worden.

Abb. 1: Apparatur zur amperometrischen Titration



Ausschlag am
Meßinstrument

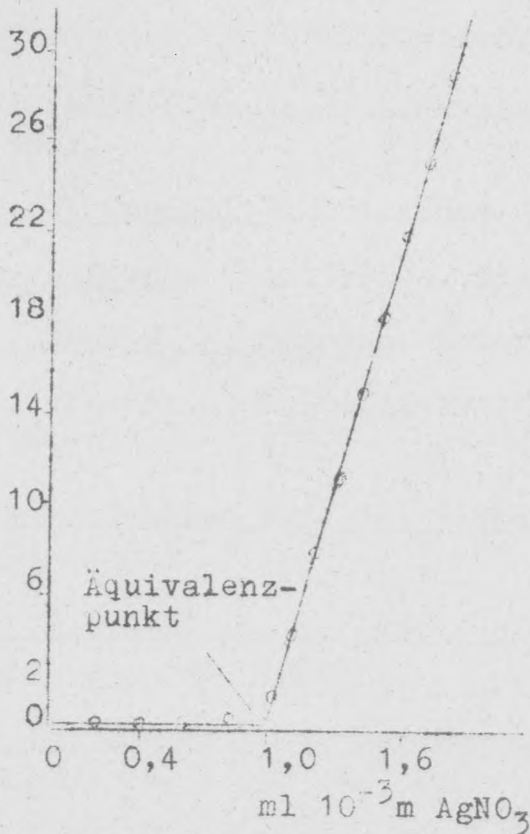


Abb. 2:

Titrationsskurve einer
amperometrischen Titration,
in diesem Falle von 1 ml
 $10^{-3} \text{ m SH-Glutathion}$

L i t e r a t u r

- 1) S. Rapoport u. D. Scheuch, Acta biologica et medica. Internationales Symposium über molekulare Zellphysiologie, Akademie-Verlag, Berlin (Ost) 1964, S. 203
- 2) J. F. Mc Carthy u. C. G. King, Food Res. 7, 295 (1942)
- 3) A. A. Sokolow u. M. S. El Dashluty, Izv. Vysshikh. Uchebn. Zavedenii, Pishchevaya Tekhnol. 1963 (4), 86.-Ref.: Chem. Abstr. 60, 2255 g (1964)
- 4) J. Ullmann, Spisy privodovedecke Fak. Univ. Brno 20, 452 (1959)-Ref.: Chem. Zbl. 1964, Nr. 21, 2659
- 5) J. J. Connell, J. Sci. Food Agric. 11, 245 (1960)
- 6) A. W. Khan, L. Van den Berg u. C. F. Leutz, J. Food Sci. 28, 425 (1963)
- 7) A. M. Erdman u. B. M. Watts, Food Technol. 11, 183 (1957)
- 8) G. G. Kielley u. B. M. Watts, Food Technol. 11, 114 (1957)
- 9) B. M. Watts, A. M. Erdman u. J. Wentworth, Agric. Food chem. 3, 147 (1955)
- 10) N. N. Krylowa, K. J. Basarowa u. W. W. Kusnezowa, Vortrag auf d. 8. Europ. Kongreß der Fleischforschungsinstitute, Moskau 1962 - Ref.: Fleischwirtschaft 14, 1174 (1962)
- 11) D. Chajuss u. J. V. Spencer, J. Food Sci. 27, 303, 411 (1962)
- 12) J. J. Connell, J. Sci. Food Agric. 8, 526 (1957)
- 13) K. Hofmann, Chemie-Diss. Gießen 1964
- 14) R. Hamm u. K. Hofmann, Nature, 207, 1269 (1965)
- 15) R. Fraczak u. P. Pajdowski, Przemysl Spozywczy 9, 334 (1955)
- 16) A. R. Johnson u. J. R. Vickery, J. Sci. Food Agric. 15, 695 (1964)
- 17) E. P. Mecci, E. L. Phippen u. H. Lineweaver, J. Food Sci. 29, 393 (1964)
- 18) L. E. Olson, D. A. Greenwood, H. M. Nielson u. E. B. Wilcox, Food Res. 24, 696 (1959)

- 19) R. Lontie u. G. Beckers, J. Indian Chem. Soc. 33, 285 (1956); zit. in (20), S. 344
- 20) R. Benesch u. R. E. Benesch, Methods of Biochem. Analysis 10, 43 (1962)
- 21) L. Rosner, J. Biol. Chem. 132, 657 (1940)
- 22) J. F. Greenstein, J. Biol. Chem. 125, 501 (1938)
- 23) R. E. Benesch, H. A. Lardy u. R. Benesch, J. Biol. Chem. 216, 663 (1955)
- 24) K. Hofmann, Jahresbericht der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, 1965 (im Druck)
- 25) A. Giroud u. H. Bulliard, Protoplasma 19, 381 (1933)
- 26) R. Pohloudek-Fabini u. K. Papke, Mikrochim. Acta 1964/5, 876
- 27) R. Hamm u. K. Hofmann, Z. Lebensm.-Unters. u.-Forsch. 129/3, 143 (1966)
- 28) R. Hamm u. K. Hofmann, Z. Lebensm.-Unters. u.-Forsch. 130, 133 (1966)
- 29) R. Hamm u. K. Hofmann, Z. Lebensm.-Unters. u.-Forsch. 130, 85 (1966)
- 30) K. Hofmann u. R. Hamm, unveröffentlicht
- 31) J. A. Maclaren, S. J. Leach u. J. M. Swan, 2nd. Quinquan Wool Text. Res. Confer. Fitre Sci. Harrogate 1960, S. 151
- 32) R. J. Block u. D. Bolling in: The Amino Acid Composition of Proteins on Food, 2nd. Edition, Springfield, Ill: G. C. Thomas 1951, S. 187
- 33) M. Halver u. G. C. Nutting, J. Biol. Chem. 166, 521 (1946)