

Der Einfluss einiger Proteasen auf das Myoglobin

N. NESTOROV, R. DIMKOV, L. LILOV

Technologisches Forschungsinstitut für Fleischwirtschaft, Sofia
Bulgarien

Die Praxis zeigt, dass die Anwendung einiger proteolytischen Enzyme in der Fleischverarbeitung zu gewissen Farbveränderungen führen kann.

Das Ziel unserer Untersuchungen war den Einfluss dieser Proteasen auf die Myoglobininlösungen spektrophotometrisch zu erforschen.

Bekanntlich, 90 % des Gesamtgehalts an Farbstoffen, welche die Fleischfarbe bedingen gehören zu dem Myoglobin und seinen Derivaten (Oxy-myoglobin und Metmyoglobin (1).

Durch Behandlung mit bestimmten Agenten kann das Myoglobin in Häm und Globin gespalten werden. Es wird hervorgehoben, dass das native Hämprotein vielmehr gegen den Einfluss äusserer Agenten, einschliesslich Proteasen widerstandsfähiger ist, als das Globin.

Das zweiwertige Eisenion des Myoglobins ist im Stande reversible eine Reihe der Ligande: Sauerstoff, Kohlenoxyd, Zyanide, Stickstoffoxyd u.a. zu verbinden (2). Das Myoglobin als Chromoprotein besitzt ein charakteristisches Absorptionsspektrum. Es wird quantitativ durch einen Spektralphotometer bestimmt und die Ergebnisse daraus sind graphisch dargestellt (3, 4).

Das Ligandieren wird von spektralen Veränderungen einschliesslich des sichtbaren Gebietes begleitet, Freilich wird das Myoglobin bzw. sein Absorptionsspektrum nicht nur durch Ligandieren, sondern auch durch eine Reihe anderer Faktoren nämlich pH, Licht, Temperatur und Sauerstoffpartialdruck u.a. beeinflusst (1, 5).

Sogar die geringsten Veränderungen der Konformation von Globin (2) können wesentlich grössere Veränderungen des funktionalen Verhaltens von Myoglobin hervorrufen (2).

Auf Grund dessen kann man annehmen, dass die Behandlung der Myoglobinpräparate mit proteolytischen Enzymen das Absorptionsspektrum des Myoglobins beeinflussen könnte. Um dies zu beweisen haben wir den Prozess der Wechselwirkung zwischen Eiweissstoffen und Proteasen an Modellen von Myoglobininlösungen erforscht. Die Veränderungen des Absorptionsspektrums bei 400—750 nm und andere Merkmale deuten auf die eintretenden Veränderungen hin.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Behandlung von Myoglobinpräparaten wurden Ficin (Calbiochem), Papain und Bromelin (Miles Chemical Company) und das proteolytische Präparat E-30 (Institut f. Mikrobiologie an der Akad. d. Wissenschaften) verwendet.

Als Versuchsmaterial wurde schlachtwarmer *M. longissimus dorsi* von Rind im Alter von 5–6 Jahren verwendet. Das Material muss unter sterilen Bedingungen entnommen werden.

Das Myoglobinpräparat wurde nach der Methode von HAMM (6) und Modifikationen vorbereitet.

100 g durchworfenes Muskelfleisch wird mit 150 ml gekühltem 0,05 M Phosphatpuffer mit pH 7,0 versetzt. Mit Hilfe eines Homogenisators Typ »Unipan« wird das Gemisch innerhalb 2 Minuten bei 8000 U/m homogenisiert, innerhalb 25 Minuten bei 5000 X g und Temperatur von 0–4° C zentrifugiert. Um die Oberflächefettschicht entfernt zu werden, wird das Supernatant filtriert und mit Puffer auf Extinktionswert von 0,900 bei 546 nm erdünnert. Die Absorptionsspektrumveränderungen von Myoglobin und seinen Derivaten werden mit Hilfe eines Registrierspektralphotometers gemessen (5).

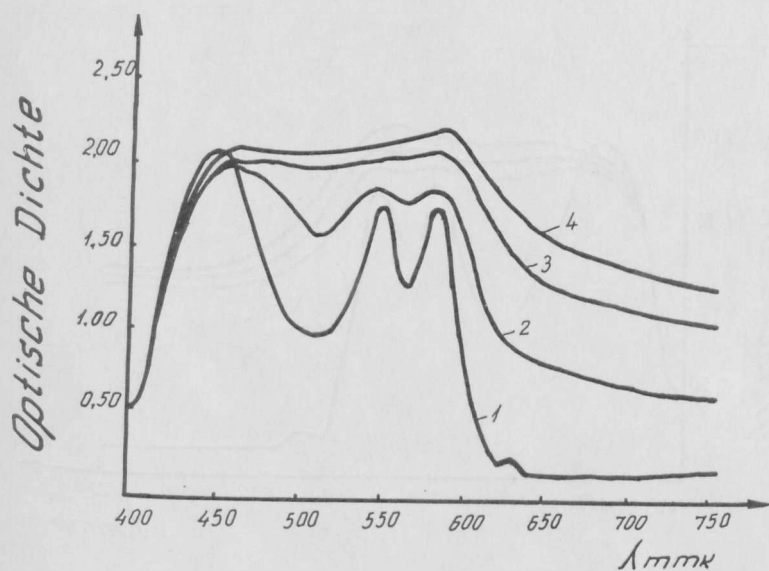


ABB. 1. Einfluss von Ficin auf das Absorptionsspektrum des Myoglobins nach 30 minutiger Inkubation bei 20° C. 1-Kontrolle; 2-Ficin 40 mkg/ml; 3-Ficin 80 mkg/ml; 4-Ficin 160 mkg/ml.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Untersucht wurde der Einfluss von Ficinkonzentration (40,80 oder 160 μg Enzymeiweiss pro ml Reaktionsgemisch) auf das Absorptionsspektrum des Myoglobins. Die Messungen wurden nach der Zugabe der Proteasen und 30 Minuten später durchgeführt. Während extempore keine merkliche Veränderungen beobachtet werden, treten nach 30 minutiger Inkubation bei Zimmertemperatur irreversible Veränderungen des Absorptionsspektrums auf. Die Veränderungen sind am stärksten bei der höchsten Konzentration der Proteasen.

Visuell wird eine Trübung der Myoglobinlösungen beobachtet und spektrographisch eine Erweiterung der Zone von SORET, -Ausgleich von δ - und β Piks in der Zone Q/entsprechend bei 582 und 545 nm und starkes Ausziehen der spektralen Kurven im Bereich der grossen Wellenlänge /bei $\gamma < 600$ nm.

Die letzte Erscheinung wird von entsprechender Verminderung der Lichtdurchlässigkeit proportional der angewendeten Ficinkonzentration begleitet. Unter den gleichen Bedingungen wurde auch der Einfluss von Papain untersucht.

Die durch Papain hervorgerufenen Veränderungen denjenigen von Ficin ähnlich sind, doch verhältnismässig in niedrigerem Grade.

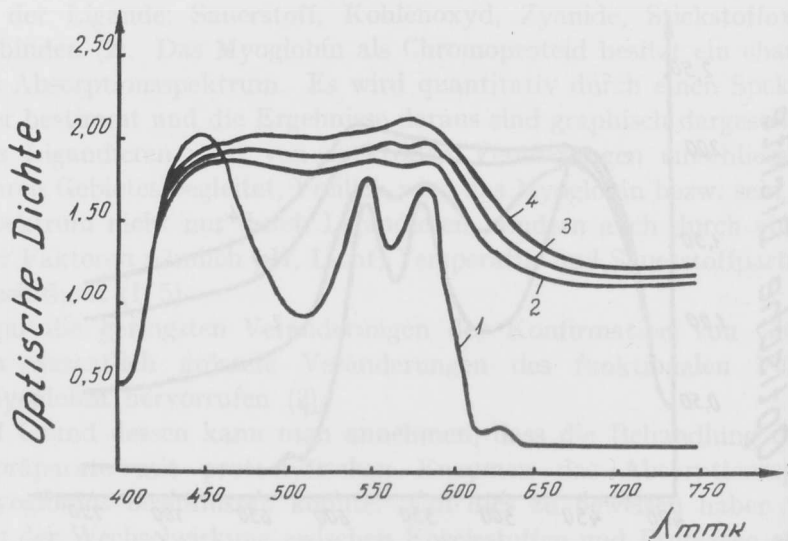


ABB. 2. Einfluss von Bromelin auf das Absorptionsspektrum des Myoglobins nach 30 minutiger Inkubation bei 20° C. 1-Kontrolle; 2-Bromelin 12 mg/ml; 3-Bromelin 25 mg/ml; 4-Bromelin 50 mg/ml.

Experimentell wurde bewiesen, dass die Bromelinkonzentration keinen gut ausgedruckten Effekt besitzt.

Die Veränderungen hervorgerufen durch 12 μg Bromelin und 50 μg Bromelin innerhalb 30 Min. decken sich. (Abb. 2). Die Wirkung des proteolytischen Präparats auf das Absorptionsspektrum des Myoglobins ist der Wirkung von Papain ähnlich. Es wurde die Dynamik der Myoglobinveränderungen während der Inkubationszeit untersucht. Als Kriterium wurden die scharfen Veränderungen in der Zone Q und die progressive Zerstreuung bei der Lichtwelle $\gamma > 600 \text{ nm}$ angenommen. Unsere Versuche zeigen, dass die Wirkungsdynamik der verwendeten 4 Enzyme unterschiedlich ist. Z.B. das Bromelin wirkt am stärksten bei Beginn der Inkubation d.h. von 0 bis zu der 3. Minute und schliesst seine Wirkung nach der 6. Mi-

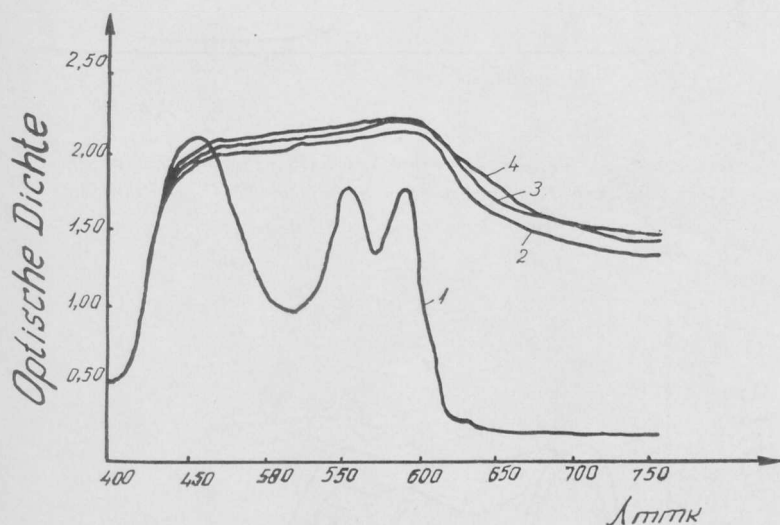


ABB. 3. Einfluss von Bromelin (50 mkg/ml) auf das Absorptionsspektrum des Myoglobins bei 20°C . 1-in der 0 min. (Kontrolle); 2-nach 3 min.; 3-nach 6 min.; 4-nach 12 min.

nute (Abb. 3), die optimale Wirkung von Papain und E-30 liegt zwischen der 3. und 6. Minute. Den maximalen Effekt erreicht das Ficin zwischen der 6. und der 12. Minute der Inkubation. Diese Versuche werden mit Enzymkonzentrationen gleicher proteolytischen Aktivität durchgeführt. Aus den Ergebnissen über die 30 minutige Inkubation bei 37°C geht hervor, dass das Ficin und das Bromelin sich durch eine stärkere Wirkung im Vergleich zu den Papain und E-30 auszeichnet (Abb. 4).

Es wurden Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen ($0,20$ und 37°C) innerhalb 30 Minuten bei Anwendung von Bromelin (Abb. 5) durchgeführt.

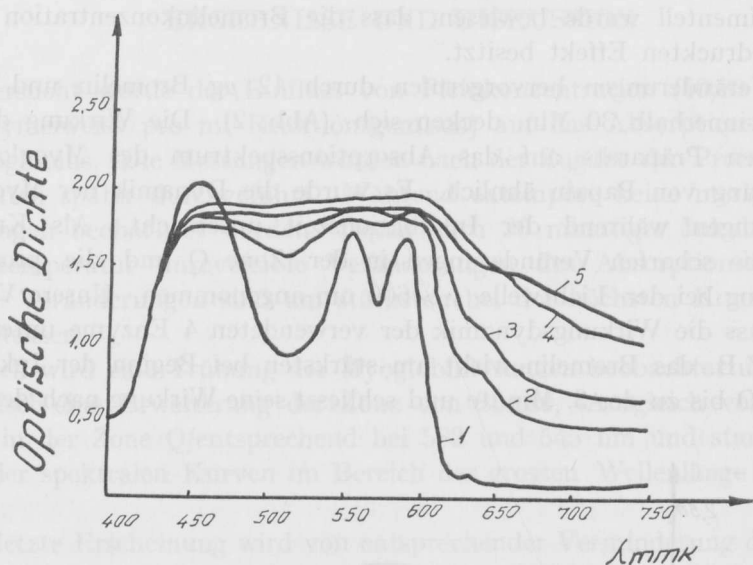


ABB. 4. Einfluss von Ficin, Papain, Bromelin und E-30 (25 mkg/ml) auf das Absorptionsspektrum des Myoglobins nach 30 minutiger Inkubation bei 37° C. 1-Kontrolle; 2-Papain; 3-E-30; 4-Ficin; 5-Bromelin.

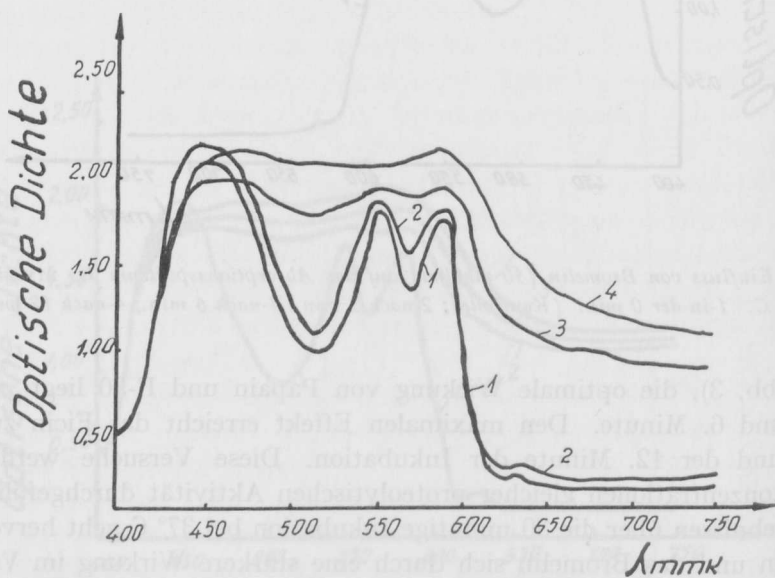


ABB. 5. Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Inkubation der Myoglobinlösungen mit Bromelin (25 mkg/ml) nach 30 minutiger Einwirkung. 1-Kontrolle (bei 20° ohne Bromelin); 2-Inkubation mit Bromelin bei 20° C; 3-Inkubation mit Bromelin bei 20° C; 4-Inkubation mit Bromelin bei 37° C.

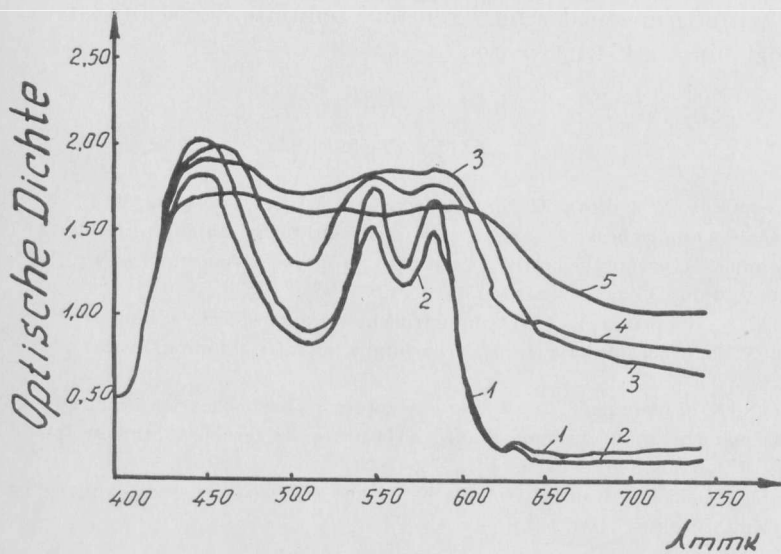


ABB. 6. Einfluss von pH bei 30 minutiger Inkubation der Myoglobinlösungen mit Bromelin (50 $\mu\text{kg/ml}$ bei 37°C). 1-Kontrolle (bei 20°C , ohne Inkubation); 2-bei pH 7,0 ohne Bromelin; 3-bei pH 7,0 mit Bromelin; 4-bei pH 8,0 ohne Bromelin; 5-bei pH 8,0 mit Bromelin.

Es wurden auch Versuche mit 50 μg Bromelin pro ml und pH für das Myoglobin und Enzymlösungen 7,0 und 8,0 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Veränderungen des Absorptionsspektrums des Myoglobins unter der Wirkung der verwendeten Enzymlösungen bei pH 8 (Abb. 6) in Stärke ausgeglichen sind.

Die Interpretation der Ergebnisse ist durch die Tatsache beschränkt weil die zu grunde liegenden Erscheinungen als Ergebnis verschiedener Bestandteile und Bedingungen zu betrachten sind (Abb. 5).

Wir sind geneigt anzunehmen, dass die Veränderungen in dem Absorptionsspektrum des Myoglobins durch die Veränderungen der Konformation des Eiweisses und die daran anschliessenden Veränderungen der Chromoforgruppe — Häm zurückzuführen sind.

Von einer typischen Proteolyse bei diesen verhältnismässig kurzen Inkubationszeiten ist kaum zu sprechen. Dies wird auch durch unsere Ergebnisse über die Werte von Hydrolysaten bei 280 nm, welche auf keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit Proteasen behandelten und unbehandelten Proben hinwiesen.

Der Einfluss der betreffender Proteasen auf die Myoglobinlösungen könnte nur durch Ausdehnung der Peptidkette (7) und die teilweise Denaturierung und Destruktion der Globinmoleküle und vorläufige oder beg-

leitende Veränderungen der tertiären und teilweise der sekundären Struktur des Myoglobins erklärt werden.

LITERATUR

1. Ljaskowskaja J. N., Krilova N. N., Wolowinskaja W. P., Piulskaja W. I., Kelman B. J. «Primenenie chimitscheskich konsrvantov, antiokislitelei, stabilisatorow i ionoobmenich smol w mjasnoi promischlenosti». Pischtschevaja promischlenost, Moskwa, 1967.
2. Antonini Eraldo. Phys. reviews, v. 45, 1, 123, 1965.
3. Babko A. K., Pilipenko A. T. «Photometritscheskii analiz», isd. «Chimija», Moskwa, 1968.
4. Krilova N. N., Ljaskovskaja J. N., «Biochimija mjassa», Pischtschevaja prom., Moskwa, 1968.
5. Krilova N. N., Lukonina I. N., Wlijanie nekotorigh physitscheskich i chimitscheskich faktorov na pigmenti mischetschnoj tkani», XIII ewrop. kongress rabotkikow NII mjas.prom. 1968.
6. Hamm, R., «Fleischwirtschaft», 44, 773, 1964.
7. Haggis Dj., Michi D., Mjuir A., Robertis K., Uoker P. Wwedenie w molekularnuj biologiju», isd. 2 «Mir», Moskwa, 1967.