

DIE STUFENWEISE DENATURATION DER EIWEISSE  
UND DIE PERSPEKTIVEN IHRER ANWENDUNG

D4

A. Kalaidjiew, Berlin

Der Aufbau der Eiweisse umfaßt die primären, die sekundären, die tertiären, die quartären und die übermolekularen Strukturen. Man versteht unter primären Strukturen solche, die durch kovalente chemische Bindungen entstehen. Unter den letzten sind die Peptidbindungen die schwächsten. Das für die einzelnen Eiweisse spezifische Merkmal der primären Strukturen ist die Aminosäuresequenz der einzelnen Aminosäuren in der Peptidkette. Die Wasserstoffbindungen zwischen den Peptidbindungen, die Van der Waals'schen-, Hydrophoben- und Ionogenen-Bindungen zwischen den Seitenketten der Aminosäuren innerhalb der Subunits halten die sekundären und tertiären Strukturen zusammen. Bindungen derselben Art zwischen den einzelnen Subunits, innerhalb der Eiweissmolekel bestimmen die quartären Strukturen der Eiweisse. Geschwächte Bindungen dieser Art zwischen den einzelnen Molekeln ergeben die übermolekularen Strukturen.

Die Denaturation der Eiweisse ist ein Vorgang, bei welchem neue, denaturierte Strukturen aus der "nativen" Struktur durch Brechen oder durch Entstehen von nichtkovalenten Bindungen resultieren. Die denaturierten Eiweisse haben entsprechend ihrer veränderten Struktur auch veränderte Eigenschaften.

Seit einigen Jahrzehnten läuft die Diskussion über den Charakter des Denaturationsvorganges : Ist dieser Vorgang kontinuierlich, d.h. läuft der Vorgang durch unendlich viele Zustände, oder es existieren endlich viele Stufen mit wohldefinierten Strukturen?  
(6) In Folgendem möchte ich an Hand einiger Beispiele aus unserer

Forschung zeigen, dass bei der Denaturation eine Reihe durch ihre Eigenschaften wohldefinierte Strukturen entstehen. Als denaturierende Faktoren haben wir Hitze bei 65°C und 90°C und Ansäuern (pH 2,5) und Alkalisieren (pH ca 11) angewandt. Abbildung 1 zeigt ein solches Beispiel. Das Kaninchenserumalbumin wurde bei den in der Abbildung gegebenen Temperaturen für jeweils 20 Minuten erhitzt, nachher rasch abgekühlt und elektrophanisiert. Bei der Papierelektrophorese oder Agarelektrophorese kann man in diesem Falle wenigstens drei Stufen nachweisen, die sich voneinander ihrer Wanderungsgeschwindigkeit nach streng unterscheiden (2,7). Abbildung 2 zeigt ähnliches bei hitzedenaturiertem alfa-Laktalbumin.

Die polaroskopischen Kurven in der Abbildung 3 zeigen, dass bei Ansäuern von Rindererumalbumin ein neuer Zustand der Eiweissmolekel entsteht, der durch neue Energieniveaus des kapazitiven Stromes gekennzeichnet wird. Ähnliche Änderungen der Potentiale des kapazitiven Stromes und die Entstehung neuer Einschnitte in den polaroskopischen Kurven lassen sich auch beim Alkalisieren beobachten (Abbildung 4). Der zeitliche Verlauf der Alkalidenaturation zeigt auch, dass wenigstens drei voneinander zu unterscheidende und nach einander folgende Stufen zu beobachten sind. (4). Ein kurzer Film am Ende wird es zeigen.

Die Anwendung der Immunodiffusions- und Immunoelktrophoresemethoden erlauben weitere Differenzierung zwischen den einzelnen Zwischenstufen der Denaturation.

Abbildung 5 zeigt Immunoelktrophorese-Bilder von Humangammaglobulin gegenübergestellt den Antiseren, die mit nativem oder hitzedenaturiertem Gammaglobulin hergestellt worden sind. Die Antiseren gegen hitze-, alkali- und säuredenaturiertem Serum zeigen bei Gammaglobulin mehrere neue Präzipitationslinien, die mehreren

neuen Denaturationsstufen entsprechen. (3,8). Die selben Seren gegen denaturiertes Gammaglobulin zeigen nicht nur mit *Macacus irus* Präzipitationslinien, sondern auch mit einer Reihe anderer Tiere der Klasse Mammalia (Abbildung 6), z.B. mit Serum von Canis. Daraus kann man ableiten, dass einige Denaturationsstrukturen des Gammaglobulin des Menschen bei den Serumproteinen einiger Tiere wiederzufinden sind. (1).

Der Vergleich der Elektrophoresebilder von Seren einiger Blutspender mit solchen von Patienten zeigt auch eine Erhöhung der Zahl der Präzipitationslinien der Kranken, die durch antidenaturierte Seren erzeugt werden können (Abbildung 7). Insgesamt lassen sich durch Immunelektrophorese bei Gammaglobulin 17 verschiedene Präzipitationslinien beobachten, die bei verschiedenen Bedingungen aus dem Gammaglobulin entstehen.

Diese Beispiele zeigen eindeutig, dass die Denaturation durch mehrere wohldefinierte Stufen durchläuft. Weiter sind einige dieser Zustände auch in Tier- oder Menschenserum ohne eine vorherige Denaturation wiederzufinden, was für ihre relative Stabilität und Selbständigkeit spricht.

Die Erfahrung hat gezeigt, dass je komplizierter die Eiweißmolekel aufgebaut ist und je mehr Subunits enthält, desto mehr Zwischenstufen ergeben sich. Das Entstehen solcher Zwischenstufen überhaupt, ist nicht für einzelne Eiweißarten spezifisch, sondern es ist zu erwarten, dass das bei allen Eiweißen der Fall ist. Andererseits ist es auch bekannt, dass nicht nur die physikochemischen und immunologischen Eigenschaften der Eiweiße von der Denaturation abhängig sind. Dazu zählen auch die Eigenschaften der Eiweiße, die eine praktische Bedeutung haben, wie z.B. die Verdaulichkeit, der Geschmack, die Haltbarkeit, der Geruch, die

Strukturierung als Nahrungsmittel und viele andere. Daraus ergeben sich die Bedeutung und die Perspektiven der Forschung zur Anwendung der stufenweisen Denaturierung auch in der Nahrungsmittelchemie. Eine Möglichkeit besteht darin, die Eiweissynthese in tierischen Körpern durch angepasstes Futter und Lebensbedingungen so zu lenken, dass Eiweisse entstehen, die bevorzugte Strukturen haben, die gewünschte Eigenschaften besitzen. Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung dieser Erkenntnisse bei der Bearbeitung tierischer Produkte. Die gewöhnlichen Methoden der Bearbeitung führen zur Eiweissdenaturierung durch Wärme, Ansäuern, Alkalisieren, partielle proteolytische Spaltung in Subunits u.ä. Durch Anwendung von komplexen physikochemischen und immunologischen Methoden wird es möglich sein, den Denaturationsvorgang viel exakter zu verfolgen und dort abubrechen, wo stufendenaturierte Eiweisse entstehen, die von der Praxis gewünschten Eigenschaften haben. Die Anwendung solcher objektiven Methoden erlauben den Denaturationsvorgang bei der Bearbeitung tierischer Produkte exakter durchzuführen.

## Literatur

1. Dathe, , Kalaidjiew, A.  
Wassilewa, I. - unveröffentlicht
2. Kalaidjiew A., Segal, J. - Die Struktur biologisch aktiver  
Eiweisse.  
Verlag d. Humboldt-Universität 1966
3. Kalaidjiew, A., Prokop, O. - unveröffentlicht
4. Kalaidjiew, A. - Mitteilung an der Jahrestagung der  
Deutschen Biochemischen Gessell-  
schaft, Rostock 1967
5. Moldenhauer, H., - Dissertation, Humboldt-Universität  
Berlin (1965)
6. Segal, J., Dornberger-  
Schiff, K., Kalaidjiew, A. - Globular Protein Molecuils- their  
Function and Dynamic-Properties  
Deutscher Verlag d. Wissenschaften  
Berlin, 1961
7. Segal, L., Segal, J.,  
Münchmeyer, R. - Mitteilungsblatt d. Biophysik.  
Gesellschaft der DDR, 19, 1, ff.  
(1964)
8. Wassilewa, I., - Dissertation, Humboldt-Universität  
Berlin (1970)

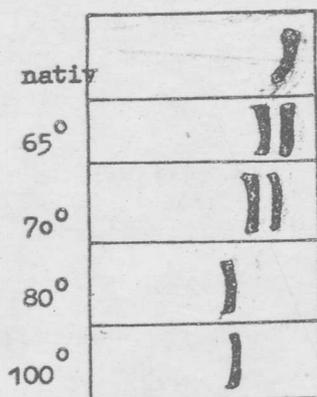


Abb. 1

Papierelektrophorese von hitzedenaturiertem, sehr schonend und daher unvollständig gereinigtem Kaninchenserumalbumin

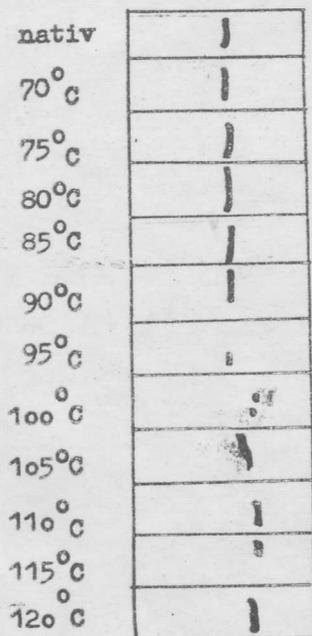


Abb. 2 Papierelektrophorese von hitzedenaturiertem - Laktalbumin. Keine Verlangsamung der Wanderung bei 70°. Beschleunigung und Herabsetzung der Farbstoffbindung ab 95°

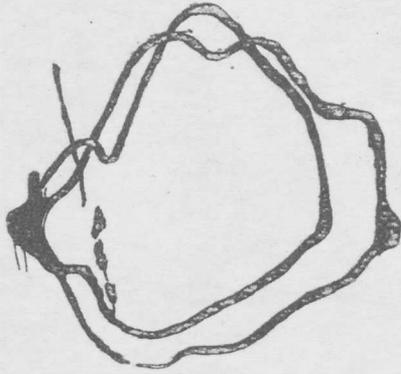


Abb. 3



Abb. 4

anti  
nativ

nativ

anti  
65°

65° denaturiert

anti  
90°

90° denaturiert

anti  
NaOH

NaOH denaturiert

anti  
HCl

HCl denaturiert

Abb. 5

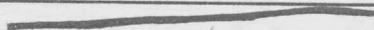
---

---

anti  
nativ



○  
macacus



---

---

anti  
NaOH



○  
macacus



---

---

anti  
nativ



canis

---

---

anti  
NaOH



canis



Abb. 6

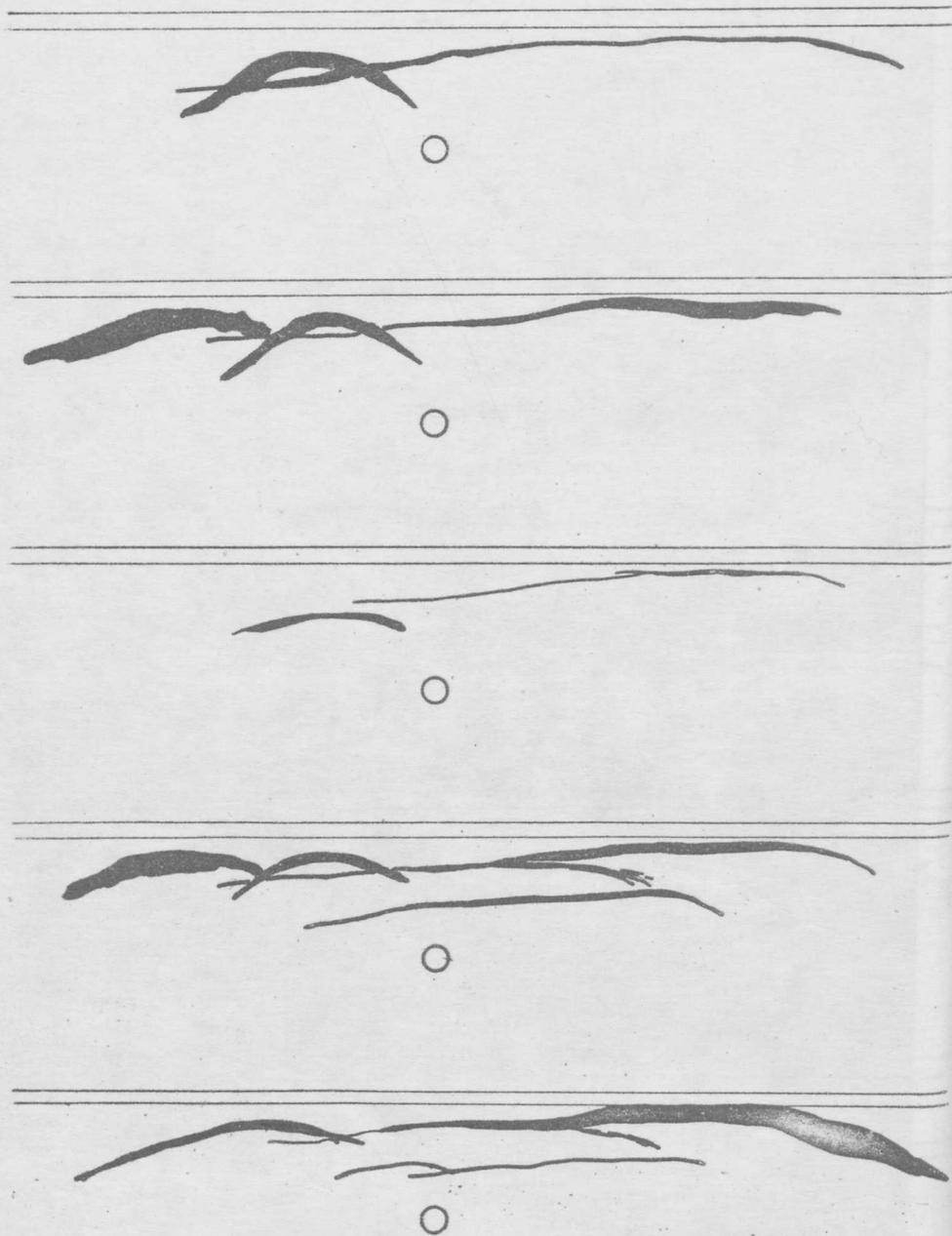


Abb. 7