

1425. Rudolf Springer und Karl Ernst Quentin

Das Verhalten von Proteinschwefel beim enzymatischen Abbau von Eiweiß

5. Mitteilung zur Kenntnis des Proteinschwefels^{1) 2) 3) 4)}

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München
und der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie München

(Eingegangen am 23. März 1955)

Bei der Spaltung proteinhaltiger Substanzen tritt, wie in früheren Arbeiten gezeigt wurde^{1) 2) 3) 4) 5)}, unter verschiedenen Bedingungen der Proteolyse ein Verlust an schwefelhaltigen Aminosäuren, besonders an Cystin und Cystein auf. Für die hierbei stattfindenden Umwandlungen der Bindungsformen des Schwefels wird der energische Eingriff verantwortlich gemacht, den eine viele Stunden andauernde Behandlung mit Säuren oder Basen in der Siedehitze darstellt. Ein Verlust an schwefelhaltigen Aminosäuren ist im Hinblick auf ihre Bedeutung — Methionin rechnet zu den essentiellen Aminosäuren — mit einer Wertminderung verbunden.

In dieser Untersuchung stellten wir uns das Ziel, den Verbleib des Schwefels unter den Bedingungen der enzymatischen Proteolyse zu verfolgen. So gewonnene Erzeugnisse finden vielfach therapeutische Anwendung. Sofern es sich nicht um sogenannte „Autolysate“, z. B. aus Leber und Hefe hergestellt, handelt, benutzt man in der Technik beim enzymatischen Eiweißabbau die nach den üblichen Verfahren gewonnenen Fermentpräparate.

Die fermentative Eiweißspaltung scheint sich „in vivo“ wesentlich leichter zu vollziehen, als es „in vitro“ nachzuahmen ist. Besonders in technischem Maßstabe ist sie schwer durchführbar. Nur wenige, z. T. patentrechtlich geschützte Verfahren sind bekannt⁶⁾.

Die enzymatische Spaltung verläuft hier selten vollständig. *L. Miller* und Mitarbeiter⁷⁾ fanden nach der enzymatischen Proteolyse von Sojabohneneiweiß nur 75% der Aminosäuren wieder, die nach Salzsäurehydrolyse ermittelt werden konnten. Eine Literaturübersicht, wie sie z. B. *J. Schormüller*⁸⁾ gibt, vermittelt den Eindruck, daß Methionin und wahrscheinlich auch Cystin zu den Aminosäuren gehören, die beim fermentativen Eiweißabbau nur langsam und unvollständig frei werden.

Wir verfolgten den Verbleib des Proteinschwefels beim Abbau von Kasein, Weizenkleber, einer auf Molke gezüchteten Hefe und einer Sulfitablaugehefe. Die genannten Naturprodukte stellen häufig das Ausgangsmaterial für die Gewinnung sog. Aminosäuregemische dar.

¹⁾ 1. Mitteilung: *R. Springer* und *K. E. Quentin*, *Biochem. Z.* 322, 180 (1951).

²⁾ 2. Mitteilung: *R. Springer* und *K. E. Quentin*, *Biochem. Z.* 322, 486 (1952).

³⁾ 3. Mitteilung: *R. Springer* und *K. E. Quentin*, *Biochem. Z.* 325, 21 (1953).

⁴⁾ 4. Mitteilung: *R. Springer* und *R. Woller*, *Biochem. Z.* 325, 376 (1954).

⁵⁾ *R. Springer* und *R. Woller*, *Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.* 287/59, 565 (1954).

⁶⁾ Beschrieben bei *K. Schiller*, Suppen, Würzen und Brüherzeugnisse, Stuttgart: Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft (1950).

⁷⁾ *L. Miller*, *O. M. Searl* und *J. H. Lempere*, *Arch. Biochemistry* 3, 359 (1948).

⁸⁾ *J. Schormüller*, *Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch.* 99, 214 (1954).

Tabelle 1
Schwefelhaltige Aminosäuren nach enzymatischer Proteolyse
(im Vergleich zur Salzsäurehydrolyse)

	Art des Abbaues, angewandtes Fermentpräparat					
	Salzsäure- hydrolyse %	Pepsin %	Trypsin %	Kathepsin %	Papain %	Pepsin- Trypsin %
1. Kasein	Proteingehalt: 98,7 %; Schwefelgehalt: 0,87 % Organisch gebundener Schwefel: 0,837 % = 96,27 % vom Gesamt-S					
Cystin-Cystein	0,44	0,22	0,39	0,42	0,40	0,42
Cystin-Cystein-Schwefel	0,12	0,06	0,10	0,11	0,11	0,11
Methionin	3,11	1,57	3,01	3,04	3,06	3,05
Methionin-Schwefel	0,67	0,37	0,65	0,65	0,66	0,66
Aminosäure-Schwefel	0,79	0,43	0,75	0,76	0,77	0,77
Anteil des Aminos.-S am organ. geb. S	93,9	57,3	89,7	91,4	91,6	91,6
2. Weizenkleber	Proteingehalt: 80,97 %; Schwefelgehalt: 1,03 % Organisch gebundener Schwefel: 1,02 % = 99,08 % vom Gesamt-S					
Cystin-Cystein	1,89	0,80	0,99	0,95	1,43	1,40
Cystin-Cystein-Schwefel	0,50	0,21	0,26	0,25	0,38	0,37
Methionin	1,60	0,99	1,07	1,11	1,15	1,40
Methionin-Schwefel	0,34	0,21	0,23	0,24	0,25	0,30
Aminosäure-Schwefel	0,84	0,42	0,49	0,49	0,63	0,67
Anteil des Aminos.-S am organ. geb. S	83,2	41,8	48,4	48,2	61,7	66,2
3. Molkenhefe	Proteingehalt: 54,54 %; Schwefelgehalt: 0,42 % Organisch gebundener Schwefel: 0,407 % = 96,6 % vom Gesamt-S					
Cystin-Cystein	0,42	0,31	0,35	0,31	0,44	0,40
Cystin-Cystein-Schwefel	0,11	0,08	0,09	0,08	0,12	0,11
Methionin	0,62	0,39	0,56	0,51	0,59	0,60
Methionin-Schwefel	0,13	0,08	0,12	0,11	0,12	0,12
Aminosäure-Schwefel	0,24	0,16	0,21	0,19	0,24	0,23
Anteil des Aminos.-S am organ. geb. S	60,2	40,9	52,3	47,4	60,2	58,0
4. Sulfitablaugehefe	Proteingehalt: 38,51 %; Schwefelgehalt: 0,74 % Organisch gebundener Schwefel: 0,437 % = 59,05 % vom Gesamt-S					
Cystin-Cystein	0,40	0,27	0,29	0,33	0,39	0,45
Cystin-Cystein-Schwefel	0,11	0,07	0,08	0,09	0,10	0,12
Methionin	0,47	0,38	0,39	0,40	0,42	0,46
Methionin-Schwefel	0,10	0,08	0,08	0,08	0,09	0,10
Aminosäure-Schwefel	0,21	0,15	0,16	0,17	0,19	0,22
Anteil des Aminos.-S am organ. geb. S	47,6	35,0	36,9	39,8	44,9	50,1

Aus den Resultaten der Untersuchungen (Tab. 1) ergeben sich folgende Beobachtungen und Schlüsse:

Unter den angewandten Versuchsbedingungen wird lediglich das Kasein — abgesehen von dem Ansatz mit Pepsin und Salzsäure, bei dem 8,3% verblieben — so weitgehend abgebaut, daß kein filtrierbarer Rückstand zurückbleibt. Eine Gesetzmäßigkeit, d. h., daß beispielsweise nach der Einwirkung von Papain, das sich als sehr wirkungsvoll erwies, eine geringere Menge ungelöster Substanzen resultierte, war nicht zu erkennen. Die Rückstände betrugen im Durchschnitt bei Weizenkleber 11—13%, bei der Molkenhefe 26—29% und bei der Sulfitablaugehefe 24—28%. Diese Rückstände erwiesen sich als schwefelhaltig, sind aber nicht gleich schwefelreich. Zwischen 6 und 30,5% des organisch gebundenen Schwefels verbleiben darin. Übereinstimmend kann festgestellt werden, daß die proteinreichen Substanzen Kasein und Weizenkleber wenig und schwefelarmen Rückstand bilden, während die Hefen, die etwa nur zur Hälfte bzw. nicht einmal zu 40% aus Eiweiß bestehen, einen bedeutenden, schwefelreichen Rückstand hinterlassen.

Bei den enzymatischen Proteolysen werden unter den gewählten Bedingungen die schwefelhaltigen Aminosäuren unvollständig aus dem Proteinverband in freie Säuren übergeführt. Nur in wenigen Fällen konnten ähnlich hohe Gehalte an Cystin und Methionin ermittelt werden wie sie nach Hydrolyse mittels Salzsäure vorlagen. Die Pepsin-Trypsin-Kombination erwies sich als besonders günstig. Pepsin-Salzsäure setzte nur mangelhaft schwefelhaltige Aminosäuren in Freiheit.

Auch hier ist, ähnlich der Beobachtung, daß unterschiedliche Rückstände mit differierendem Schwefelgehalt verbleiben, festzustellen, daß die proteinreichen Substrate (Kasein und Weizenkleber) unter den verschiedenen Bedingungen des enzymatischen Abbaues günstigere Ergebnisse liefern als die proteinärmeren Hefen. Der Anteil des organisch gebundenen Schwefels, der freien Aminosäuren zugehört, liegt besonders günstig beim Kasein. Interessant ist der bedeutende Unterschied in der Ausbeute an freien schwefelhaltigen Aminosäuren bei der auf dem „biologischen Milieu“ gezüchteten Molkenhefe und der Sulfitablaugehefe.

Im Verlaufe der sauren und alkalischen Proteolyse war eine Zunahme an Sulfatschwefel (mineralischem Schwefel) zu beobachten¹⁾. Ein Ansteigen des analytisch erfaßbaren Sulfations ist auch unter der Einwirkung von Enzympräparaten feststellbar. Bei Pepsin-Salzsäure-Einwirkung ist in allen Fällen ein deutlicher Sulfatzuwachs zu verzeichnen, teilweise werden sogar die Werte, die sich nach einer 16stündigen Hydrolyse mittels Salzsäure ergaben, erreicht. Während der Sulfatschwefel bei Kasein und Weizenkleber nur wenig zunahm, bewirkten Pepsin und Salzsäure ein stärkeres Ansteigen bei den Hefen. Nach 48stündiger Einwirkung wurden bei Kasein und Weizenkleber etwa 1,5%, bei Molkenhefe etwa 7,5% und bei Sulfitablaugehefe etwa 14% des organisch gebundenen Schwefels zusätzlich in Sulfat übergeführt.

Auch bei der Proteolyse im alkalischen Milieu mittels Trypsin konnte ein Sulfatzuwachs in ähnlicher Höhe beobachtet werden. Offenbar vollzieht sich hier unter der Einwirkung von Alkali die Sulfatbildung noch leichter.

Bei Untersuchungen, denen andere Fragestellungen zugrunde lagen, stellte W. Kruckenberg⁹⁾ fest, daß in einem methioninhaltigen Aminosäuregemisch, das mit Natronlauge versetzt unter Luftzutritt länger stehen blieb, eine Oxydation zum Sulfon und Sulfoxyd stattfand. Eigene Arbeiten führten zu dem Ergebnis, daß nach achtstündiger Hydrolyse mittels 15%iger Natronlauge bei den hier angewandten Untersuchungssubstanzen im Durchschnitt 18% Methionin und 60% Cystin weniger resultierten als nach 16stündiger Salzsäurehydrolyse.

Der Sulfatzuwachs bei der Proteolyse ist nicht nur das Ergebnis einer Hitzebehandlung mit Säuren oder Laugen. Eine „Mineralisierung“ von Schwefel, d. h. eine Überführung in analytisch erfaßbares Sulfat, findet auch unter den Bedingungen des enzymatischen Abbaues *in vitro* statt. Wir deuten die erhöhten Sulfatwerte auf zwei Weisen: Die Proteine okkludieren, wie wir besonders bei Untersuchungen an Milch feststellen konnten, Sulfat, das sich demzufolge der analytischen Ermittlung entzieht. Nach erfolgter Proteolyse fällt diese Erscheinung fort. Schwefelsäure kann ferner in Naturprodukten in recht unterschiedlichen

⁹⁾ W. Kruckenberg, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 284, 25 (1949).

Mengen als Schwefelsäureester vorliegen. Unter den Maßnahmen der verschiedenen Möglichkeiten des Abbaues, auch des enzymatischen, wird, wie wir an anderer Stelle zeigen konnten⁴⁾, Esterschwefelsäure in das leicht erfaßbare Sulfation übergeführt. — Die Untersuchungsergebnisse sprechen nicht dafür, daß beim fermentativen Eiweißabbau in größerer Menge Aminosäureschwefel in Sulfatschwefel umgewandelt wird.

Beschreibung der Versuche

„Pepsin“, „Trypsin“ und „Papain“ waren Trockenpräparate der Firma *E. Merck*, Darmstadt. „Kathepsin“ wurde nach den Angaben von *W. Deutsch* und *E. Waldschmidt-Leitz*¹⁰⁾ als Fermentlösung hergestellt.

Der Abbau mittels Pepsin erfolgte nach der von *K. Wedemeyer*¹¹⁾ angegebenen Versuchsanordnung.

Abbau mittels Trypsin: Man übergießt 2 g Substanz mit 50 ml einer Lösung, die 10 g Trypsin und 24 ml n-Natronlauge im Liter enthält. Nach Einstellen des p_H -Wertes auf 8,0 fügt man 10 ml Phosphatpufferlösung ($p_H = 8,04$) hinzu. Es hat sich als notwendig erwiesen, den p_H -Wert laufend zu überprüfen und öfter zu korrigieren. Versuchsdauer: 48 Std., Temperatur: 37° C. Es erfolgte ein Zusatz von Toluol, um einen Verderb zu verhindern¹²⁾.

Abbau mittels Kathepsin: Es konnte die Versuchsanordnung von *K. G. Stern*¹³⁾ zugrunde gelegt werden. Es wurden 2 g Substanz mit 20 ml der frisch hergestellten Fermentlösung, 10 ml Veronalpuffer sowie 20 ml Wasser versetzt. Einstellen des $p_H = 4,90$ mittels 0,1 n-Salzsäure. Auch dieser Ansatz bleibt unter laufender Überprüfung des p_H -Wertes 48 Std. bei 37° C stehen.

Abbau mittels Papain: Das zur Verfügung stehende Präparat war nur zu 85% wasserlöslich. Zunächst wurde 1 g in 100 ml Wasser aufgenommen. Es folgte die Aktivierung in 50 ml des Filtrates (entsprechend 425 mg Papain) durch Zusatz von 120 mg Kaliumcyanid und 10 ml Citratpufferlösung ($p_H = 4,9$) während zweier Stunden bei 37° C. Das Reaktionsgemisch verbleibt nach Zusatz von 2 g Untersuchungssubstanz 48 Std. bei einer Temperatur von 60° C¹⁴⁾.

Kombinierter Abbau mittels Pepsin und Trypsin: Zunächst werden, wie bereits angeführt¹¹⁾, 2 g der Substanz während 24 Std. mit Pepsin-Salzsäure behandelt. Nach dieser Zeit erhitzt man das Reaktionsgemisch zur Inaktivierung des Pepsins 15 Min. im siedenden Wasserbade. Nach Abkühlen wird auf 500 ml aufgefüllt und mit 5 n-Natronlauge die Hälfte der Flüssigkeit auf $p_H = 8,0$ eingestellt. Weiterbehandlung: Nach Zugabe von Trypsinlösung und Phosphatpufferlösung weitere 24 Std., wie bereits beim Abbau mittels Trypsin beschrieben¹⁵⁾.

Die Fermentpräparate wiesen ausnahmslos einen Gehalt an Schwefel auf, der berücksichtigt werden mußte (Tab. 2).

¹⁰⁾ *W. Deutsch* und *E. Waldschmidt-Leitz*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 167, 285 (1927); vgl. *A. Schöffner* in *E. Bamann* und *K. Myrbäck*, Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig (1941), New York (1945), S. 2070.

¹¹⁾ *K. Wedemeyer*, Zit. bei *J. Großfeld*: Anleitung zur Untersuchung der Lebensmittel, Berlin: *J. Springer* (1927); *A. Beythien*, Laboratoriumsbuch für den Lebensmittelchemiker, 5. Aufl., Dresden und Leipzig: Theodor Steinkopff (1947).

¹²⁾ *J. Schormüller*, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 89, 481 (1949).

¹³⁾ *K. G. Stern*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 199, 169 (1931); vgl. *B. J. Krijgsmann*, in *E. Bamann* und *K. Myrbäck*: Die Methoden der Fermentforschung, Leipzig (1941), New York (1945).

¹⁴⁾ *A. Schöberl* und *R. Hamm*, Biochem. Z. 318, 331 (1948.)

¹⁵⁾ *L. V. Hanks*, *W. H. Riesen*, *L. M. Henderson* und *C. A. Elvehjem*, J. biol. Chemistry 176, 467 (1948).

