

Proteindenaturierung:

Inhalt

- ❑ Was passiert bei einer Denaturierung?
- ❑ Eigenschaften der Proteine
- ❑ Möglichkeiten zur Fällung/Denaturierung
- ❑ Gründe für Fällungen
- ❑ Beispiele

Was passiert bei einer Denaturierung?

- Strukturveränderung der Proteine: Sekundär- bis Quartärstruktur verändern sich; Primärstruktur bleibt erhalten
- Lösen von Bindungen im Proteinmolekül
- Freilegung von im Inneren gelegenen funktionellen Gruppen
- Herstellung einer energieärmeren Form (117 KJ/mol werden frei)

Was passiert bei einer Denaturierung?

- ❑ Denaturierung auch Flockung oder Fällung der Proteine
- ❑ Durch Auflösen der Bindungen orientiert sich das Proteinmolekül neu – eine Wechselwirkung mit anderen Molekülen erfolgt und es entstehen größere Teilchen – Flockung!
- ❑ Die Denaturierung setzt den Nährwert der Proteine nicht herab, denaturierte Milchproteine sind sogar besser verdaulich!

Physikalisch-chemische Eigenschaften der (Milch-) Proteine

- Elektrische Ladung und Hydratation
- Isoelektrischer Punkt
- Ionenkonzentration
- Permittivität
(Änderung der Dielektrizitätskonstante)
- Optische Eigenschaften

Physikalisch chemische Eigenschaften der (Milch-) Proteine

Elektrische Ladung und Hydratation:

Die Zahl der elektrischen Ladungen und ihr Verhältnis zueinander auf der Oberfläche des Proteinteilchens sind verantwortlich für:

- Hydratation/Dehydratation und ermöglichen die kolloidale Löslichkeit
- Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld
- den sauren o. basischen Geschmack des nativen Proteins
- puffernde Wirkung

Ursache: elektrostatische Wechselwirkungskräfte zwischen den polaren Gruppen im Protein und den Dipolkräften der Wassermoleküle;

Physikalisch-chemische Eigenschaften der (Milch-) Proteine

Isoelektrischer Punkt:

- Das ist der pH-Wert, bei dem die gleiche Anzahl positiver und negativer Ladungen auf den Teilchen vorhanden ist und keine Wanderung im elektrischen Feld erfolgt.
- Der isoelektrische Punkt ist eine charakteristische Eigenschaft der Proteine. z.B. Fällung der Proteine durch Säurezugabe

Auswirkungen:

- Hydratation ist am schwächsten
- höchste Fällungsneigung der Proteine

Anwendung: Fällung / Trennung von Proteinen,
Identifizierung von Proteinen

Physikalisch-chemische Eigenschaften der (Milch-) Proteine

Ionenkonzentration

Salting in - Effect

Adsorption (=Festhalten) der Ionen an der Oberfläche, durch Zugabe von Kationen z.B. Calcium



bessere Löslichkeit

Anwendung:

Milchpulver zur Untersuchung
Lösen gefällter Proteine

Salting out - Effect

z.T. Entzug der Hydrathülle



Flockung (Koagulation)

Fraktionierung der Milchprot.

Enteweißung von Milch und Molke

Unterscheidung hoch- und niedrig erhitzter Milchpulver

Klärung, Schönung v. Säften, Pökeln

Physikalisch-chemische Eigenschaften der (Milch-) Proteine

Permittivität (Änderung der Dielektrizitätskonstante):

<http://de.wikipedia.org/wiki/Permittivit%C3%A4t>

Organische Lösungsmittel verringern die Löslichkeit der Proteine, da die „Dielektrische Konstante“ erniedrigt wird. Das führt zu einer Erhöhung der Anziehungskraft zw. den Proteinmolekülen und eine Erniedrigung der Wechselwirkung zw. Wasser- und Proteinmolekülen.

Anwendung: Kontrolle des Frischezustandes der Milch mit 68% Alkohol

Physikalisch-chemische Eigenschaften der (Milch-) Proteine

Optische Eigenschaften:

- ❑ Die optischen Eigenschaften der Proteinlösungen werden zur Ermittlung der Konzentration von Protein- oder Proteinmischungen herangezogen.

Von Bedeutung sind dabei:

- ❑ die Absorption
- ❑ die Refraktion
- ❑ die Polarisation

Möglichkeiten zur Proteinfällung

Reversible Fällung

Die Fällung kann rückgängig gemacht werden.

Dabei müssen die Parameter genau eingehalten werden:

- ❑ verdünnte Säuren (pH-Wertverschiebung)
- ❑ Salze (gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung)
- ❑ Alkohol

z.B.: Milch – Ausfällung durch Säure ist reversibel

Möglichkeiten zur Proteinfällung

Irreversible Fällung:

- ❑ konzentrierte Säure (HNO_3)
- ❑ Schwermetallsalze (AgNO_3)
- ❑ Organische Lösungsmittel, 96% Alkohol
- ❑ Chemikalien, die auf die funktionellen Gruppen wirken:
 - Gerbstoffe, Tannin, Harnstoff, Guanidin
- ❑ Enzyme
- ❑ Temp. $>65^\circ\text{C}$,
- ❑ Druck- und Scherkräfte, Schallenergie (Ultraschall)
- ❑ Energiereiche Strahlung

Gründe für Proteinfällungen:

- ❑ Analytik: Enteiweißen im Labor z.B. Carrezklärung
- ❑ Differenzieren von Eiweiß (Sorten / Rassen)
- ❑ Identifizierung von Fremd-Eiweiß in Lebensmitteln
- ❑ Nachweise in der Medizin (Esbach-Reagenz)
- ❑ Gewinnung technologisch / pharmazeutisch interessanter Fraktionen („Pharming“)

Proteinreinigung, warum?

Durch Proteinfällung können die verschiedenen Proteinfractionen getrennt werden.

Zur:

Analyse der enzymatischen Eigenschaften

- (Substrate, Kinetik, Inhibitoren)

Analyse der Struktur

- Aminosäuresequenz
- Raumstruktur (CD, NMR, X-Ray von Kristallen)

Einsatz als Reagenz

- in Biotechnologie (Amylase, Proteasen
- in Diagnostik (Glucose-Oxidase, Peroxidase, Urease..)

Einsatz als Therapeutikum

- Insulin, Wachstumshormon, Albumin, EPO,
- Gerinnungsfaktor VIII, Immunglobuline

Fraktionierung der Milchproteine

Milch
500mg N / 100ml

Säuern auf pH 4,6 mit Essigsäure/ Na-Acetat - Puffer

Niederschlag
Serum

Kasein
410mg N (82%)

Filtrat

Molkenprotein
90mg N (18%)

alles was bei pH 4,6 und 20°C ausfällt

Halbsättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
od. Sättigung mit MgSO_4

Niederschlag

Lactoglobulin
20mg N (4%)

Filtrat

Lactalbumin
70mg N (14%)

Milchproteine

Caseine 80 %		Molkenproteine 20 %	
α_s - Casein	40 %	Lactalbumin	12 %
β - Casein	24 %	Lactoglobulin	5 %
κ - Casein	12 %	Immunoglobuline	2 %
γ - Casein	4 %	andere	1%

AS-Zusammensetzung der Milchproteine:

- AS Sequenz ist genetisch bestimmt, Rassenmerkmal, Lactationsstadium

Aminosäurezusammensetzung von Gesamtprotein der Milch (g Aminosäure/100g Protein)

Neutral unpolar: Aminosäure		Neutral polar: Aminosäure	
Anteil		Anteil	
L-Alanin	3,7	L-Cystein	0,8
Glycin	2,2	L-Methionin	2,9
L-Isoleucin	6,2	L-Serin	5,8
L-Leucin	10,4	L-Threonin	4,8
L-Phenylalanin	5,3	L-Tryptophan	1,5
L-Prolin	10,2	L-Tyrosin	5,4
L-Valin	6,8		
Sauer:		Basisch:	
Aminosäure	Anteil	Aminosäure	Anteil
L-Asparaginsäure	8,2	L-Arginin	3,6
L-Glutaminsäure	22,8	L-Histidin	2,8
		L-Lysin	8,3

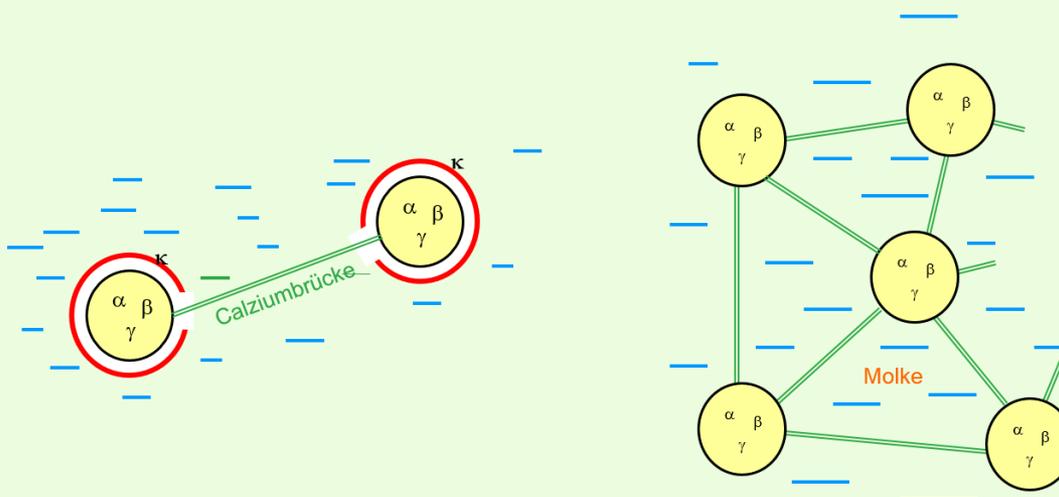
essentielle Aminosäuren

Caseinfällung durch Lab

Primärphase (Enzymatische Phase):



Sekundärphase (Gerinnungs- oder Koagulationsphase):



Was wird unter Kopräzipitaten verstanden?

- Kombination aus Hitze- (90-95°C) und Säurebehandlung (pH4,6-4,9), dabei wird das Casein und Molkenprotein gleichzeitig ausgefällt.
- → Geschmacksverstärker, höhere EW-Ausbeute und höherer Weißkraft bei Kaffeemilch und höhere Trockensubstanz und Stabilität beim Joghurt.