



Technische Universität München

Technische Universität München · Z I E L
Abt. Technologie · Weihenstephaner Berg 1 · 85350 Freising · GERMANY



Wissenschaftszentrum
Weihenstephan
Z I E L Zentralinstitut für Ernährungs-
und Lebensmittelforschung

Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrens-
technik und Molkereitechnologie

Abteilung Technologie

Prof. Dr.-Ing.
Ulrich Kulozik

Förderprojekt 2849 der Max-Buchner-Forschungstiftung

Abschlussbericht

Förderprojekt: Optimierte Prozessbedingungen zur enzymatischen Hydrolyse von Caseinomakropeptid sowie seiner glykosylierten und nicht-glykosylierten Fraktionen.

Das Marktsegment der funktionellen Lebensmittel gewinnt in der deutschen Lebensmittelindustrie immer mehr an Bedeutung. Wachsendes Interesse kommt dabei der Gruppe an biofunktionellen Peptiden zu. Je nach Aminosäuresequenz und Struktur besitzen diese Peptide eine positive Wirkung auf die unterschiedlichen Systeme des menschlichen Organismus. So wurden beispielsweise dem Caseinomakropeptid (CMP) bereits eine immunfördernde bzw. antithrombotische Wirkung nachgewiesen. Bedingt durch seine Struktur kann CMP aber auch antimikrobiell wirken oder zur Kariesprophylaxe genutzt werden (Abd El-Salam et al., 1996; Bal dit Sollier et al., 1996).

Um die funktionellen Eigenschaften dieser bioaktiven Peptide nutzen zu können, sind Verfahren notwendig, durch die gezielt spezifische Peptide produziert werden können. Eine solche Möglichkeit bietet die enzymatische Hydrolyse. Die dabei eingesetzten Proteasen schneiden das Substrat nur an für sie spezifischen Schnittstellen, so dass die Zusammensetzung des Hydrolysats durch die Wahl des Enzyms gezielt beeinflusst werden kann. Dabei wird die Freisetzung unterschiedlicher Peptide durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst. So spielen sowohl die Wahl der Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Temperatur) der enzymatischen Hydrolyse als auch die Reinheit des Ausgangssubstrats eine bedeutende Rolle (Cheison et al., 2011).

Eine genauere Betrachtung des CMP zeigt, dass es sich hier um eine heterogene Gruppe von Makromolekülen handelt. Zum einen unterscheidet sich CMP durch genetische Variationen in zwei Aminosäuren, zum anderen kann es durch unterschiedliche post-translationale Modifikationen im Phosphorylierungs- und Glykosylierungsgrad der Aminosäuresequenz differenziert werden. Derzeit sind fünf mögliche Bindungsstellen im Glykomakropeptid für die unterschiedlichen Zuckerreste, bestehend aus N-Acetylglucosamin, Galactose und Sialinsäure bekannt. Unterschiedliche Studien weisen nach, dass bis zu 50 % des CMP in glykosylierter Form als glycoCMP (gCMP), der Rest als aglycoCMP (aCMP) vorliegt (Holland et al., 2006).

Inwieweit die Glykosylierung und der Glykosylierungsgrad einen Einfluss auf die biofunktionellen Eigenschaften des CMP besitzen, kann derzeit noch nicht benannt werden. Auch ist noch nicht genau geklärt, inwieweit das Makromolekül als Ganzes oder einzelne Peptidsequenzen daraus die physiologisch positiven Wirkungen hervorrufen. Unabhängig von der Sequenz des Peptids häufen sich jedoch die Vermutungen, dass vor allem die gebundenen Glykane für die Biofunktionalität verantwortlich sind (Beucher et al., 1994). Dies ist unter anderem auf den protektiven Effekt der Kohlenhydratketten während der Wechselwirkung des Makromoleküls mit Proteasen zurückzuführen.

Um den Einfluss der Glykane auf die Hydrolyse jedoch genau benennen zu können, ist eine getrennte Betrachtung der glykosylierten und nicht-glykosylierten Fraktion erforderlich. Dazu wurde am durchführenden Institut der TU München ein Verfahren entwickelt, mit dem gCMP und aCMP aus einem CMP-Konzentrat durch Membranadsorptionschromatographie fraktioniert werden können (Kreuß et al., 2009).

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der Glykosylierung auf die möglichen Schnittstellen eingesetzter Enzyme aufzuzeigen. Dabei wurden zwei Vertreter der Gruppe der Serinoproteasen, Trypsin und Chymotrypsin, eingesetzt. Zusätzlich wurde durch Variation ausgewählter Prozessparameter Einfluss auf die Enzymaktivität und -spezifität genommen. Durch denselben originären Ursprung der beiden Enzyme konnten die Milieubedingungen der Hydrolyse in gleichem Maße variiert werden. Dabei wurden pH-Wert, Temperatur und das Enzym-Substrat-Verhältnis verändert. Der pH-Wert wurde während den Hydrolysen auf 7, 8 oder 9 mittels pH-stat Methode konstant gehalten und die Temperatur in einem Bereich zwischen 30 und 50 °C variiert.

Bei der tryptischen Hydrolyse des CMP ergeben sich aufgrund der Spezifität der Protease nur die C-terminalen Peptidbindungen von Lysin und Arginin zu spalten, innerhalb der Aminosäuresequenz des CMP unter optimalen Bedingungen theoretisch drei unterschiedliche Schnittstellen. Da das Makropeptid in seinem molekularen Aufbau nicht die Aminosäure Arginin enthält, handelt es sich bei allen für das Enzym spezifischen Schnittstellen um C-terminale Peptidbindungen des Lysins (Lys6, Lys7, Lys11). Theoretisch ergibt sich dadurch ein maximaler Hydrolysegrad (DH_{max}) von 4,76 %, wobei der Hydrolysegrad (DH) den prozentualen Anteil an gespaltenen Peptidbindungen im Verhältnis zu allen Peptidbindungen wieder gibt. Dagegen ist die Substratspezifität des Enzyms Chymotrypsin deutlich geringer. Zwar katalysiert Chymotrypsin bevorzugt die Spaltung der C-terminalen Peptidbindungen der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, hydrolysiert aber auch die Peptidbindungen anderer hydrophober Aminosäuren. So schneidet Chymotrypsin ebenso nach Leucin und Methionin und ist ebenfalls in der Lage, die C-terminalen Peptidbindungen von Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure zu spalten.

Die möglichen Schnittstellen sind in der folgenden Abbildung für das Enzym Trypsin mit einem roten Rechteck und für das unspezifischere Chymotrypsin mit einem blauen Rechteck in der Aminosäuresequenz des CMP gekennzeichnet. Zudem sind die möglichen Glykosylierungsstellen nach Holland et al. (2006) mit Sechsecken gekennzeichnet.

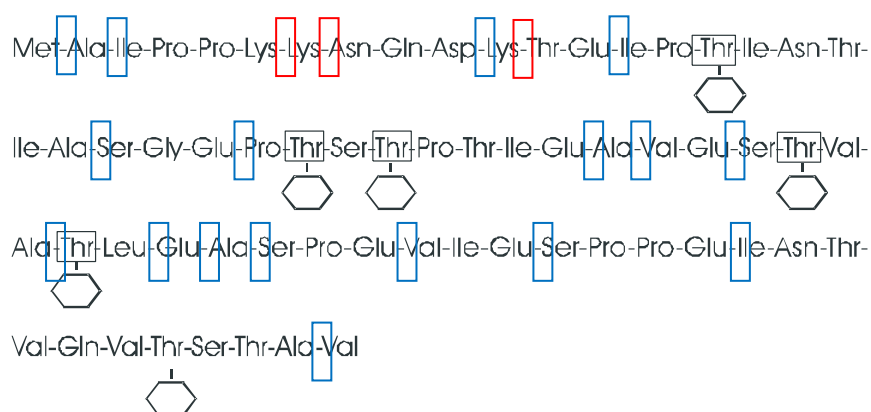


Abbildung 1: Aminosäuresequenz des CMP und die darin möglichen Schnittstellen für Trypsin (rot) und Chymotrypsin (blau), gekennzeichnet durch Rechtecke

Ergebnisse zur tryptischen Hydrolyse

Der Einfluss der gebundenen Glykane auf die Zugänglichkeit des Enzyms zum Peptidgrundgerüst des CMP wurde durch dessen Abbau im zeitlichen Verlauf der Hydrolyse erfasst.

Der prozentual verbleibende Gehalt an nicht hydrolysiertem aCMP und gCMP unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen nach 10 minütiger Hydrolyse ist in Abb. 2 dargestellt.

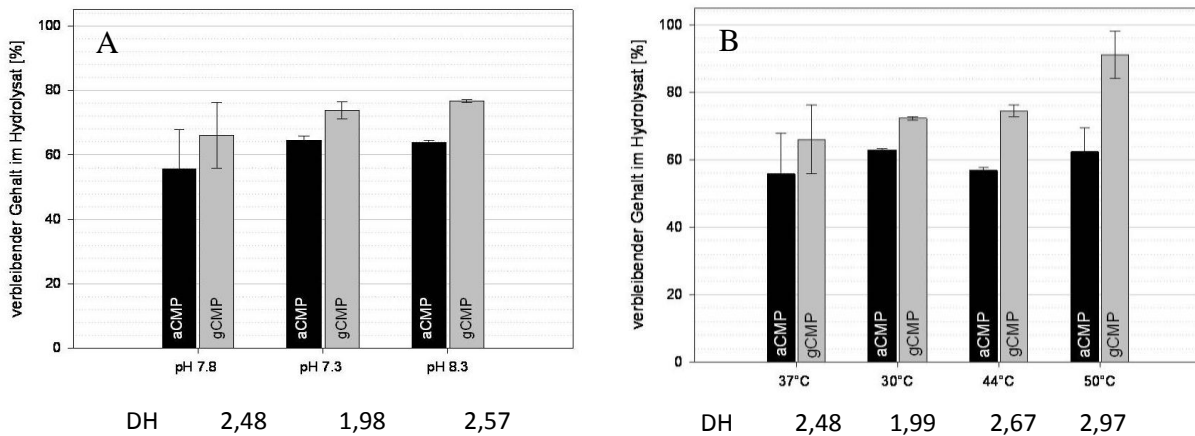


Abbildung 2: Prozentuale Menge an nicht-hydrolysiertem aCMP und gCMP nach 10 minütiger tryptischer Hydrolyse (5 %ige Ausgangslösung, E/S-ratio = 1 %) und die dabei ermittelten Hydrolysegrade (DH) bei Variation des pH-Werts (A) und der Temperatur (B)

Daraus ist erkennbar, dass unabhängig vom pH-Wert der Ausgangslösung und der Hydrolysetemperatur der Restgehalt des gCMP stets um ca. 10 % höher ist als der des aCMP. Diese Tatsache kann auf den Schutzeffekt der Glykane zurückgeführt werden. Es ist davon auszugehen, dass durch die verhältnismäßig großen Zuckerreste eine sterische Hinderung bei der Wechselwirkung zwischen dem Enzym und Peptidgrundgerüst auftritt. Die relative Größe der gebundenen Glykane im Vergleich zum Peptidgrundgerüst des CMP ist in der folgenden Abbildung exemplarisch anhand eines zweifach glykolysierten CMP dargestellt.

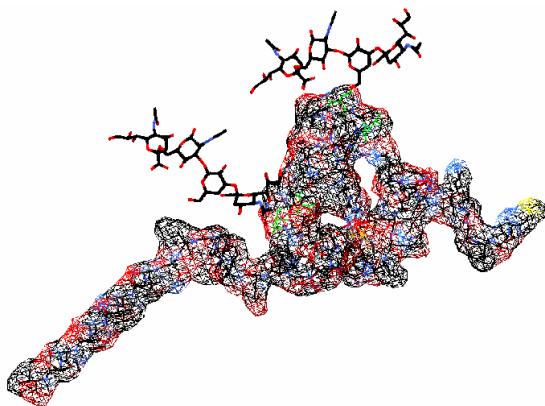


Abbildung 3: Darstellung eines zweifach glykosylierten CMP Moleküls mit zwei gebundenen Tetrasacchariden. Die Größenverhältnisse der Zuckerseitenketten sind maßstabsgetreu zur Darstellung der CMP Struktur. Bezugswert 1,3 Å. [Guex und Peitsch, 1997; Guex et al., 1999].

Bei einem Vergleich des prozentual verbleibenden Anteils beider Fraktionen und der ermittelten Hydrolysegrade (Abb. 2A) ist bemerkbar, dass bei pH 8,3 im Vergleich zu den optimalen Bedingungen (pH 7,8) trotz vergleichbarem DH der prozentuale Anteil des nicht-hydrolysierten aCMP und gCMP deutlich größer ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Affinität des Enzyms zu Peptidbindungen bereits gebildeter Spaltprodukte der Hydrolyse größer ist als zu dem Makropeptid selbst.

Betrachtet man den verbleibenden prozentualen Anteil des aCMP und gCMP nach 10 minütiger Hydrolyse bei den unterschiedlichen Reaktionstemperaturen, so sind, wie in Abb. 2B sichtbar, bei allen gewählten Reaktionsbedingungen Unterschiede im prozentualen Abbau zwischen aCMP und gCMP feststellbar. Das

Ausmaß der Differenz ist jedoch von den Reaktionsbedingungen abhängig, wobei eine maximale Differenz bei einer Hydrolysetemperatur von 50 °C festgestellt wurde. In diesem Fall konnte ein Unterschied von nahezu 25 % in den verbleibenden prozentualen Gehalten des aCMP und gCMP im Hydrolysat ermittelt werden. Durch Änderung der Temperatur von 37 °C auf 30 °C und 44 °C wurde nur gering Einfluss auf den verbleibenden Gehalt an aCMP und gCMP im Hydrolysat genommen. Werden die ermittelten Hydrolysegrade der Reaktionen mit dem prozentualen Abbau der aCMP und gCMP Fraktionen kombiniert, sind Änderungen in der Enzymaffinität zum ursprünglichen Substrat in Abhängigkeit der Temperatur feststellbar. Trotz des gesteigerten DH und damit auch der Anzahl an gespaltenen Peptidbindungen mit zunehmender Temperatur veränderte sich nur der prozentuale Abbau des gCMP im Hydrolysat bei einer Temperatur von 50 °C. Somit konnte durch die Erhöhung der Temperatur, vor allem bei 50 °C, eine sinkende Affinität des Enzyms zu den Peptidbindungen des Ausgangssubstrats ermittelt werden. Unter diesen Bedingungen trat vor allem die Hydrolyse bereits gebildeter Spaltprodukte auf.

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der massenspektrometrischen Identifikation der Hydrolysate bei den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen nach 10 minütiger Hydrolyse wieder (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mittels MALDI-TOF/MS identifizierte Peptide bei unterschiedlichen pH-Werten

Temperatur	30 °C	37 °C			44 °C	50 °C
pH-Wert	7.8	7.3	7.8	8.3	7.8	7.8
			f(6-34)	f(6-34)		
					f(9-29)	f(9-29)
	f(11-37)					
				f(13-46)		
	f(17-22)				f(19-37)	
		f(21-28)	f(21-28)	f(21-28)		
	f(24-50)			f(25-50)	f(25-50)	f(25-50)
	f(25-31)					
	f(25-50)					
						f(29-49)
	f(34-59)	f(34-59)	f(34-59)	f(34-59)	f(34-59)	f(34-59)
				f(34-62)		
	f(37-43)					

Während bei dem pH-Wert von 7.3 nur zwei unterschiedliche reproduzierbare Spaltprodukte ermittelt wurden, konnte mit zunehmenden pH-Wert und DH eine Steigerung der Anzahl unterschiedlicher Peptide festgestellt werden. So wurden schließlich bei einem pH von 8.3 sechs unterschiedliche Peptide identifiziert. Die bei pH 7.3 identifizierten Peptide f(21-28) und f(34-59) wurden bei allen untersuchten pH-Werten entdeckt. Diese Peptidbindungen werden wohl unabhängig vom pH-Wert in einem Bereich zwischen 7.3 und 8.3 gespalten. Auch alle bei pH 7.8 identifizierten Peptide wurden durch eine pH-Erhöhung von 7.8 auf 8.3 identifiziert.

Während bei den optimalen Reaktionsbedingungen nur drei unterschiedliche reproduzierbare Peptide identifiziert werden konnten, nimmt die Anzahl der detektierten Peptide durch Abweichungen der Temperatur vom Enzymoptimum zu. Die geringste Enzymaffinität zu spezifischen Peptidbindungen ist bei einer Absenkung der Hydrolysetemperatur auf 30 °C erkennbar. Hier attackierte das Enzym 13 unterschiedliche Peptidbindungen, wodurch sieben verschiedene Peptide freigesetzt wurden. Durch Erhöhung der Temperatur wurde ebenfalls die Anzahl an identifizierten Spaltprodukten erhöht. Bei 44 °C und bei 50 °C wurden vier unterschiedliche Peptide identifiziert. Zwei dieser Peptide, f(9-29) und f(34-59), konnten bei beiden Reaktionsbedingungen identifiziert werden. Das einzige Peptid, das in allen Hydrolysaten bei Variation der Temperatur identifiziert wurde, ist das Peptid f(34-59). Es entsteht durch unspezifische Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Alanin³³ und Valin³⁴ und der Peptidbindung zwischen Valin⁵⁹ und Threonin⁶⁰.

Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Variation des pH-Werts durch eine Variation der Temperatur die möglichen Schnittstellen für das Enzym nicht erweitert, sondern verändert werden können.

Ergebnisse zur chymotryptischen Hydrolyse

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse bei der tryptischen Hydrolyse des CMP wurden die untersuchten Reaktionsvariablen der Hydrolyse angepasst. Da bei diesen Untersuchungen durch Variation des pH Werts nur sehr geringe Abweichungen des DH-Werts festgestellt wurden, wurde bei der chymotryptischen Hydrolyse der untersuchte pH-Bereich etwas breiter gefasst. Es wurden die pH-Werte 7, 8 und 9 gewählt. Des Weiteren wurde das eingesetzte Enzym-Substrat-Verhältnis (E/S) verändert. Bei der tryptischen Hydrolyse, die mit einem E/S von 1 % durchgeführt wurde, konnten neben den spezifischen Schnittstellen ebenfalls eine Vielzahl an unspezifischen Schnittstellen ermittelt werden. Diese Tatsache kann auf das relativ hohe E/S zurückgeführt werden. Daher wurden die chymotryptischen Hydrolysen bei einem E/S von 0,1 % durchgeführt.

Die Enzymaktivität wurde anhand des DH ermittelt, wobei in den folgenden Tabellen beispielhaft die DH-Werte nach einer 3-stündigen Hydrolyse aufgelistet sind.

Tabelle 2: Ermittelte Hydrolysegrade nach 3-stündiger chymotryptischer Hydrolyse einer 5 %igen CMP Lösung bei Variation der Hydrolysetemperatur

Temperatur [°C]	pH	DH [%] aCMP	DH [%] gCMP
30	8	0,75	0,85
40	8	1,15	1,35
50	8	2,00	1,10

Unter für das Enzym optimalen Bedingungen (40 °C, pH 8) konnten trotz langer Hydrolysedauer für aCMP und gCMP nur relativ geringe DH-Werte von 1,15 % und 1,35 % erreicht werden, was auf das niedrige E/S zurückzuführen ist. Durch Absenken der Temperatur von 40 °C auf 30 °C wurden die DH-Werte beider Fraktionen auf ca. 65 % erniedrigt. Gegensätzlich dazu konnte durch die Erhöhung der Hydrolysetemperatur auf 50 °C ein unterschiedlicher Effekt auf die Hydrolyse der beiden untersuchten Fraktionen ausgeübt werden. Durch Steigerung der Temperatur konnte bei der Hydrolyse des aCMP eine Steigerung der Enzymaktivität und dadurch eine Steigerung des DH auf 2,0 % ermittelt werden. Gegensätzlich dazu wurde bei gCMP durch Erhöhung der Temperatur die Enzymaktivität gesenkt und eine Reduktion des DH auf 1,1 % festgestellt.

Werden die erreichten Hydrolysegrade beider Substrate bei der Variierung des pH-Wertes miteinander verglichen, zeigen sich ebenfalls deutliche Unterschiede (Tabelle 3) zwischen der glykosylierten und nicht-glykosylierten Faktion des CMP.

Tabelle 3: Ermittelte Hydrolysegrade nach 3-stündiger chymotryptischer Hydrolyse einer 5 %igen CMP Lösung bei Variation des pH-Werts der Hydrolyse

Temperatur [°C]	pH	DH [%] aCMP	DH [%] gCMP
40	7	0,70	0,50
40	8	1,15	1,35
40	9	2,25	2,10

Aus diesen Werten ist die mögliche Beeinflussung der Enzymaktivität durch den pH-Wert der Hydrolyse deutlich erkennbar. Mit einer Erhöhung des pH von 8 auf 9 konnte bei beiden Fraktionen eine Steigerung der Hydrolyse erzielt werden. Bei diesen Bedingungen wurden die höchsten DH-Werte aller gewählten Reaktionsbedingungen ermittelt. Sie liegen sowohl bei aCMP als auch bei gCMP um mindestens das Dreifache höher als bei einem pH-Wert der Hydrolyse von 7. Beim Vergleich der erreichten Hydrolysegrade der beiden Substrate miteinander zeigen sich bei den pH-Werten 7 und 9 etwas geringere DH-Werte für gCMP, was auf den protektiven Effekt der gebundenen Glykane zurückzuführen ist. Unter den für das Enzym optimalen Bedingungen scheint dieser Effekt jedoch keinen Einfluss zu haben.

Diese Ergebnisse sind durch zwei Effekte zu erklären. Zum einen ist die Oberflächenladung des CMP vom umgebenden pH-Wert abhängig. Exemplarisch ist in Abbildung 4 das elektrostatische Potential eines aCMP-Moleküls bei ein pH von 7 dargestellt.

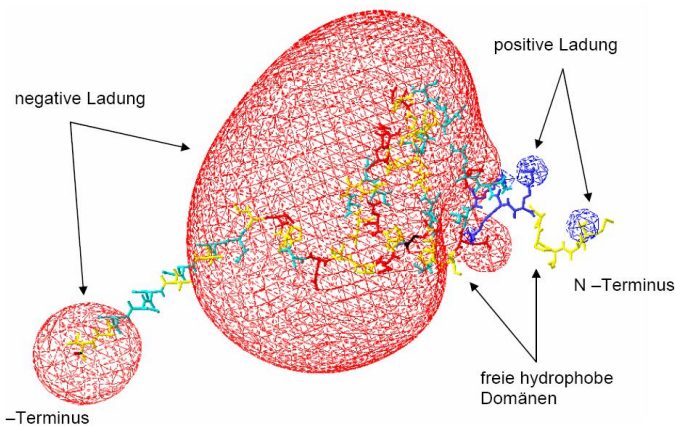


Abb. 4: Räumliche Darstellung des aCMP Moleküls mit zugehörigem elektrostatischem Potential. Ein negatives elektrostatisches Potential ist rot dargestellt, ein positives elektrostatisches Potential blau [Guex und Peitsch, 1997; Guex et al., 1999].

Durch Änderungen des pH-Werts und somit auch der Oberflächenladung des CMP können die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen verändert werden. Noch stärker ist dieser Effekt bei der gCMP Fraktion ausgeprägt. Die gebundenen Glycanketten enthalten einen großen Anteil an Sialinsäure, die bei neutralem pH-Wert stark negativ geladen vorliegt. Mit Absenkung des Hydrolyse-pH wird die negative Ladung des gCMP vermindert und dadurch auch die Wechselwirkung des CMP mit dem Enzym reduziert. Es resultieren sowohl bei aCMP als auch bei gCMP verminderte DH-Werte, wobei die Absenkung des DH bei der gCMP Fraktion deutlich ausgeprägter ist.

Zum anderen kann durch das umgebende Milieu die Spezifität des Enzyms verändert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass funktionelle Gruppen im Enzym bei einem abweichenden pH-Wert als dem des Optimums eine andere Ladung aufweisen. Vor allem His57 im katalytischen Zentrum des Chymotrypsin ist stark pH-abhängig (Hess, 1971). Eine Folge hieraus wären unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat, was die Spaltung unspezifischer werden lässt.

Bei einem Vergleich der DH-Werte der Variationen von pH und Temperatur kann festgestellt werden, dass die Hydrolysegrade bei einem pH-Wert von 7 sogar durchweg kleiner sind als bei einer Hydrolysetemperatur von 30 °C und pH 8. Die bei pH 9 deutlich erhöhten DH-Werte, sowohl beim aCMP als auch beim gCMP, sind auf eine gesteigerte Aktivität des Enzyms Chymotrypsin bei pH-Werten auch über 8 zurückzuführen. Allerdings wird der Bindungsprozess bei höherem pH-Wert nicht länger von unpolaren Interaktionen mit dem Substrat dominiert. Aus diesem Grund verliert das Enzym seine Spezifität (Welder et al., 1975).

Diese Annahme konnte durch die massenspektrometrische Analyse der Hydrolysate bestätigt werden. In Tabelle 4 sind die mittels Electrospray-Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie LC-ESI-TOF/MS identifizierten Peptide der chymotryptischen Hydrolyse bei den variierenden Reaktionsparametern dargestellt.

Tab. 4: Identifizierte Peptide der chymotryptischen Hydrolyse von aCMP und gCMP bei variierenden Reaktionsbedingungen

Fragment-position in CMP	30 °C, pH 8		50 °C, pH 8		40 °C, pH 8		40 °C, pH 7		40 °C, pH 9	
	aCMP	gCMP	aCMP	gCMP	aCMP	gCMP	aCMP	gCMP	aCMP	gCMP
f (61-63)									x	
f (55-58)			x							
f (43-50)	x									
f (44-52)			x						x	
f (16-34)			x	x	x	x	x	x	x	x
f (6-22)	x									
f (2-18)		x	x	x	x	x	x	x	x	x
f (5-21)			x			x				x
f (14-32)			x			x	x	x		x
f (28-46)	x									
f (1-18)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
f (13-32)		x	x	x	x	x	x	x		x
f (43-63)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

f (2-21)		x			x				x	
f (20-42)			x		x					
f (14-36)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
f (11-33)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
f (35-60)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
f (4-29)	x	x						x	x	
f (10-55)			x		x		x		x	
f (8-53)					x					

Betrachtet man die identifizierten Peptide unter den für das Enzym optimalen Bedingungen, so ist die Anzahl an freigesetzten Peptiden bei der enzymatischen Hydrolyse des gCMP niedriger als bei der des aCMP. Gegensätzlich zu diesen Ergebnissen wurde für die Hydrolyse des aCMP ein niedriger DH-Wert ermittelt. Daraus lässt sich ableiten, dass die gebundenen Glykane zwar die Anzahl der möglichen Schnittstellen für das Enzym einschränken können, nicht aber die Hydrolyse selbst. Genau dieser Effekt wurde ebenfalls bei Variation der Temperatur und des pH-Werts ermittelt. Wurde die Temperatur auf 50 °C erhöht, wurde die Anzahl der identifizierten Peptide von 8 bei der Hydrolyse des gCMP auf 14 bei aCMP erweitert. Gegensätzlich dazu wurde durch Absenkung der Reaktionstemperatur auf 30 °C die Anzahl der identifizierten Peptide nicht verändert, aber die vom Enzym attackierten Schnittstellen konnten verändert werden.

Durch die Absenkung des pH-Werts auf 7 konnte kein großer Einfluss auf die Enzymaffinität genommen werden. Lediglich unterschieden sich die zehn freigesetzten Peptide der beiden Fraktionen in einem Peptid. Dagegen wurde durch eine Erhöhung des pH-Werts die Affinität des Enzyms zu unterschiedlichen Schnittstellen innerhalb der beiden Fraktionen verstärkt.

Werden die identifizierten Peptide aller Reaktionsbedingungen betrachtet, wird ersichtlich, dass fünf Peptide unabhängig der gewählten Reaktionsbedingungen aus beiden Fraktionen des CMP freigesetzt wurden: f(1-18), f(11-33), f(14-36), f(35-60) und f(43-63). Diese Schnittstellen scheinen für das Enzym Chymotrypsin bei allen untersuchten Milieubedingungen und trotz gebundener Glykane zugänglich zu sein. Dagegen konnten einige Peptide bei nur bestimmten Reaktionsbedingungen freigesetzt werden. Beispielsweise das Tripeptid f(61-63), das nur bei einem abweichenden pH-Wert von 9 oder das relativ große Peptid f(8-53), welches nur unter für das Enzym optimalen Bedingungen freigesetzt wurde.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Im Rahmen dieses Projekts konnte gezeigt werden, dass bei der tryptischen Hydrolyse des CMP durch Variation der Hydrolysebedingungen und Substrateigenschaften gezielt die Freisetzung unterschiedlicher Peptide beeinflusst werden kann. Vor allem durch Änderungen der Hydrolysetemperatur kann die Enzymaktivität und –spezifität verändert und dadurch gezielt mögliche Schnittstellen für das Enzym Trypsin reduziert oder erweitert werden. Im Gegensatz dazu konnte beim Einsatz des Chymotrypsin durch variierende Milieubedingungen kaum Einfluss auf die Hydrolyse genommen werden. Die möglichen Angriffsstellen für das Enzym wurden durch Änderungen der Reaktionsbedingungen zwar erweitert und/oder variiert, jedoch war eine gezielte Lenkung der Hydrolyse durch die große Anzahl an Schnittstellen nur bedingt möglich.

Der ermittelte Einfluss der variierenden Reaktionsbedingungen auf die Enzymaktivität und –affinität des Trypsins konnte nicht bei der chymotryptischen Hydrolyse ermittelt werden. Daher ist eine Übertragung der ermittelten Einflussfaktoren und deren Auswirkungen auf die komplette Gruppe der Serinoproteasen nicht möglich.

Literaturverzeichnis

- Abd El-Salam M.H., El-Shibiny S., Buchheim W. (1996): Characteristics and Potential Uses of the Casein Macropeptide. *International Dairy Journal* 6: 327-341
- Bal dit Sollier et al. (1996): Effect of κ -Casein split peptides on platelet aggregation and on thrombus formation in the guinea-pig. *Thrombosis Research* Vol. 81: 427 – 437
- Beucher S., Levenez F., Yvon M., Corring T. (1994): Effects of gastric digestive products from casein on CCK release by intestinal cells in rat. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 5: 578-584
- Cheison S., Leeb E., Toro J., Kulozik U. (2011): Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native alpha-lactalbumin. *International Dairy Journal* 21: 166-171
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for cooperative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723
- Guex, N., & Diemand, A. P. (1999). Protein modelling for all. *TiBS* 24, 364-367
- Hess, G. P. (1971). Chymotrypsin - Chemical Properties and Catalysis. In P. D. Boyer, *The Enzymes* (pp. 213-248). New York, London: Academic Press
- Holland J. W., Deeth H.C., Alewood P. F. (2006): Resolution and characterisation of multiple isoforms of bovine κ -casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy 6: 3087-3095
- Kreuz M. & Kulozik U. (2009): Separation of glycosylated caseinomacropeptide at pilot scale using membrane adsorption in direct-capture mode. *Journal of Chromatography A* 1216: 8771-8777
- Wedler, F. C., Uretsky, L. S., McClune, G., & Cencula, J. (1975). Conformational states of chymotrypsin at high pH: Temperature effects on catalysis and binding. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 170: 476-484