

- [81] R. K. Hill, N. W. Gilman, *Tetrahedron Lett.* 1967, 1421; *Chem. Commun.* 1967, 619.
- [81a] H. E. Zimmerman, D. R. Diehl, *J. Am. Chem. Soc.* 101, 1841 (1979), dort Fußnote 8.
- [82] R. W. Hoffmann, S. Goldmann, R. Gerlach, N. Maak, *Chem. Ber.*, im Druck.
- [83] H. Felkin, C. Frajerman, *Tetrahedron Lett.* 1977, 3485.
- [84] B. M. Trost, R. F. Hamm, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 963 (1973).
- [85] B. M. Trost, W. G. Biddlecom, *J. Org. Chem.* 38, 3438 (1973).
- [86] S. J. Campbell, D. Darwisch, *Can. J. Chem.* 54, 193 (1976).
- [87] T. Numata, S. Oae, *Tetrahedron Lett.* 1977, 1337.
- [88] M. Mikolajczyk, A. Zatorski, S. Grzejszczak, B. Costisella, W. Midura, *J. Org. Chem.* 43, 2518 (1978).
- [89] M. Yoshimoto, S. Ishihara, E. Nakayama, N. Soma, *Tetrahedron Lett.* 1972, 2923.
- [90] S. Mageswaran, W. D. Ollis, I. O. Sutherland, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 656.
- [91] S. Mageswaran, W. D. Ollis, I. O. Sutherland, Y. Thebiaranonth, *Chem. Commun.* 1971, 1494.
- [92] R. W. C. Cose, A. M. Davies, W. D. Ollis, C. Smith, I. O. Sutherland, *Chem. Commun.* 1969, 293.
- [93] K. Kondo, I. Ojima, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1972, 62.
- [94] L. Leger, M. Saquet, A. Thuillier, S. Julia, *J. Organomet. Chem.* 96, 313 (1975).
- [95] V. Rautenstrauch, *Chem. Commun.* 1970, 526.
- [96] R. E. Ireland, R. H. Mueller, A. K. Willard, *J. Am. Chem. Soc.* 98, 2868 (1976).
- [97] G. Andrews, D. A. Evans, *Tetrahedron Lett.* 1972, 5121.
- [98] D. A. Evans, G. C. Andrews, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 3672 (1972).
- [99] L. N. Mander, J. V. Turner, *J. Org. Chem.* 38, 2915 (1973).
- [100] H. O. House, J. Lubinowski, J. H. Good, *J. Org. Chem.* 40, 86 (1975).
- [101] V. H. van Rheenen, K. P. Shepard, *J. Org. Chem.* 44, 1582 (1979).
- [102] R. W. Hoffmann, R. Gerlach, S. Goldmann, *Tetrahedron Lett.* 1978, 2599; *Chem. Ber.*, im Druck.
- [103] O. Eisenstein, J. Klein, J. M. Lefour, *Tetrahedron* 35, 225 (1979), zit. Lit.

Die Bildung der Raumstruktur von Proteingelen

Von M. G. Bezrukov^[*]

Der vorliegende Aufsatz befaßt sich mit den praktischen und theoretischen Aspekten der Gelbildung in Proteinsystemen. Diese Vorgänge werden u. a. dadurch kompliziert, daß mehrere Typen der Zusammenlagerung der Proteinmoleküle sowie Konformationsänderungen während der Assoziation berücksichtigt werden müssen. Das Gelnetzwerk kann durch fünf Arten der Wechselwirkung stabilisiert werden: kovalente Vernetzung, polare Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen. Die Mikrostrukturen von Gelen aus fibrillären Proteinen (Kollagen) und aus globulären Proteinen (z. B. α - und β -Casein) unterscheiden sich beträchtlich. Von praktischem Interesse sind Methoden, mit denen sich die Löslichkeit von Gelen steuern läßt. Dazu gehört die Verwendung von Vernetzungsmitteln und die Zugabe von Salzen.

1. Einleitung

Der gelartige Zustand von Biopolymeren ist die strukturelle Basis aller Lebensformen. Während bei Pflanzen in der Regel die Polysaccharide strukturelle Funktionen haben, übernehmen bei tierischen Organismen die Proteine diese Rolle. Die Gelbildung von Proteinen war nicht nur Gegenstand zahlreicher biochemischer und molekularbiologischer Arbeiten, sondern ist auch im Hinblick auf die technische Verarbeitung von Proteinen untersucht worden. Diesem technischen Aspekt kommt in jüngster Zeit im Zusammenhang mit der Entwicklung großindustrieller Verfahren zur Verarbeitung von Proteinen für Nahrungsmittel und Viehfutter besondere Bedeutung zu.

Die 1948 von *Ferry*^[1] veröffentlichte Übersicht spiegelt die damaligen Ansichten über den Gelzustand wider. Vollständig aufgeklärt ist der Gelzustand auch heute noch nicht. In diesem Aufsatz befassen wir uns vor allem mit den Organisationsformen für die räumliche Anordnung von Proteinmolekülen in gelartigen Systemen, mit den Ursachen des Auftretens dieser Raumstrukturen und mit praktischen Aspekten bei der Steuerung der Eigenschaften, die für die Funktion der Proteine erforderlich sind.

2. Klassifizierung der Gele

„Ein solcher kolloidalen Zustand eines Systems wie ein Gel ist leichter zu beobachten als zu beschreiben“ – seit

mehr als 60 Jahren führt diese Feststellung ein Nomadenleben in zahlreichen Veröffentlichungen über den Gelzustand, z. B. auch in der Übersicht von *Lipatov* und *Proshlyakova*^[2], die 1961 erschien. Es wurde jedoch schon vor 1960 eine Anzahl annehmbarer Definitionen für den Gelzustand formuliert. Wir werden im folgenden einige davon besprechen.

Nach *Flory*^[3] kann ein System als gelartig angesehen werden, wenn es sich durch die folgenden Eigenschaften auszeichnet:

1. Es ist ein kolloidales System mit mindestens zwei Komponenten;
2. es weist einige der mechanischen Eigenschaften von Festkörpern auf;
3. sowohl die dispergierte Phase als auch das Dispersionsmedium sind im Volumen des Systems kontinuierlich verteilt.

Diese umfassende Definition ist rein formaler Natur und zieht die Gründe für das Auftreten und die Existenz des gelartigen Zustands nicht in Betracht.

In den Arbeiten von *Papkov*^[4-7] werden Gele als Multikomponenten-Systeme mit den beiden folgenden charakteristischen Eigenschaften definiert: fast vollständiges Fehlen von Fluidität und hohes reversibles Deformationsvermögen.

Rogovina und *Slonimsky*^[8] definieren ein Gel als ein Polymer-Lösungsmittel-System, in dem ein räumliches Netzwerk aus ziemlich stabilen, nicht fluktuierenden Bindungen besteht (d. h. solchen, die nicht durch thermische Bewegung zerstört werden). Diese Definition scheint für die im vorlie-

[*] Dr. M. G. Bezrukov

Institute of Organoelemental Compounds, USSR Academy of Sciences
SU-117813 Moskau, Vavilova 28 (UdSSR)

genden Aufsatz besprochenen Aspekte des Problems am geeigneten zu sein; sie ermöglicht das Verständnis vieler Eigenschaften gelartiger Systeme.

In Übereinstimmung mit der Klassifizierung nach *Papkov* unterscheidet man gewöhnlich zwei Arten von Systemen, an denen eine Polymerkomponente beteiligt ist.

Typ 1: Gele, die beim Quellen vernetzter Polymere oder bei der kovalenten Vernetzung gelöster Makromoleküle entstehen. Diese Gele sind thermisch irreversibel. Das Fehlen fluider Eigenschaften in solchen Systemen beruht auf der Anwesenheit eines dreidimensionalen Molekülskeletts, das durch chemische Bindungen stabilisiert ist.

Typ 2: Gele, die bei der Trennung einer einphasigen Polymerlösung in zwei Phasen entstehen, wenn sich die thermodynamischen Bedingungen oder die Zusammensetzung des Systems ändern. Das Fehlen fluider Eigenschaften wird durch die Bildung eines dreidimensionalen Skeletts aus übermolekularen Strukturen verursacht, deren Eigenschaften denen eines Feststoffs ähneln; die reversible Deformierung geht auf die elastische Dehnung der Skelettbestandteile zurück.

Ein Netzwerk aus Polymermolekülen ist charakteristisch für ein System im Gelzustand. Die Struktur dieses dreidimensionalen Netzwerks und die Ursachen seiner Bildung können höchst unterschiedlicher Natur sein.

Bei der Bildung des Skeletts aus Polymermolekülen in Lösung spielt das energetische Gleichgewicht der Wechselwirkungen der Polymersegmente untereinander und mit dem Lösungsmittel eine Hauptrolle. Eine begrenzte Polymerlöslichkeit wird als notwendig erachtet, damit das System einen Gelzustand annehmen kann^[2, 7, 8].

Bei Polymeren mit begrenzter Löslichkeit kleben einige Segmente des Polymermoleküls aneinander und bilden so die Knotenstellen der Wechselwirkung, während die anderen Abschnitte in Lösung bleiben. Ein derartiges Verhalten liegt in der „Diphilie“ von Polymermolekülen begründet, d. h. in der Anwesenheit sowohl lyophiler als auch lyophober Bereiche. Die Knotenstellen des dreidimensionalen Netzwerks bilden sich durch Berührung von lyophoben Segmenten, während die Solvatation der lyophilen Abschnitte den Fortbestand des Netzwerks sichert. Die Natur der Kontakt-Wechselwirkungen zwischen lyophoben Segmenten ist experimentell überprüft worden^[2]; sie kann alle Arten physikalischer Bindungen (dispers, polar, Wasserstoffsbrücken) umfassen.

Wird das dreidimensionale Netzwerk durch kovalente Wechselwirkungen gebildet, so können alle Teile des Polymermoleküls vom Lösungsmittel recht gut solvatisiert werden, d. h. das Molekül muß nicht notwendigerweise diphil sein. Für die Existenz von Gelnetzwerken aus einzelnen Polymermolekülen gibt es jedoch noch keine Beispiele. Alle Gele, deren Mikrostruktur heute bekannt ist, sind durch ein Netzwerk aus übermolekularen Strukturen charakterisiert.

Die thermische Stabilität von Gelen ist durch die Temperatur begrenzt, bei der das gelbildende räumliche Skelett zusammenbricht und das System in den flüssigen Zustand übergeht, oder aber das System Lösungsmittel verliert und zu einem Xerogel wird. Gele lassen sich nach ihrer Schmelzbarkeit in thermisch reversible und thermisch irreversibile Gele einteilen.

Rogovina und *Slonimsky*^[8] sowie *Papkov*^[7] führen die thermische Irreversibilität von Gelen hauptsächlich auf die che-

mischen (kovalenten) Wechselwirkungen zwischen den Polymermolekülen zurück. Diese Wechselwirkung ist die stärkste aller im Gelnetzwerk möglichen ($\Delta G > 80$ kcal/mol).

Thermisch reversible Gele zeichnen sich durch physikalische Wechselwirkungen zwischen den Makromolekülen aus. Die Energiebeträge von Wasserstoffsbrücken sowie polaren und hydrophoben Wechselwirkungen sind beträchtlich kleiner als diejenigen kovalenter Wechselwirkungen ($\Delta G < 10$ kcal/mol). Diese physikalischen Wechselwirkungen können durch die thermische Bewegung, die der Übergangstemperatur zur flüssigen Phase entspricht, aufgehoben werden.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß Gele, die durch Wechselwirkung von Polymerketten mit mehrwertigen Kationen gebildet werden, ebenfalls thermisch irreversibel sein können. Derartige Bindungen, bei denen Segmente verschiedener Polymerketten als Liganden am Zentrum eines Komplexes fungieren, liegen energetisch zwischen den chemischen und den physikalischen Wechselwirkungen. Bei synthetischen Polymeren treten solche Wechselwirkungen recht selten auf und werden in der Regel nicht berücksichtigt. Bei Proteinsystemen ist die Wechselwirkung mit Kationen dagegen in vieler Hinsicht strukturbestimmend.

Gele lassen sich auch durch andere charakteristische Eigenschaften klassifizieren, so z. B. durch Besonderheiten der Mikrostruktur oder den Phasenzustand.

Die umfassendste Einteilung von Gelen nach ihrer Mikrostruktur stammt von *Flory*^[3]. Er unterteilt die Gele in vier Typen:

1. Hochgeordnete lamellare Strukturen, einschließlich gelartiger Mesophasen.
2. Durch physikalische Aggregation gebildete Polymernetzwerke, größtenteils ungeordnet, jedoch mit lokaler Ordnung in einigen Bereichen.
3. Ungeordnete Strukturen aus dispergierten Teilchen.
4. Kovalent verknüpfte Molekülnetzwerke ohne jegliche Ordnung.

Beispiele für den ersten Typ sind Systeme, die Phospholipide oder Seifen enthalten. Lamellare Strukturen sind bei Proteinen unbekannt; manche Bereiche nativer Kollagenfibrillen können dagegen mit einigen Vorbehalten als Mesophasen angesehen werden.

Jegliche Klassifizierung von Proteinen und ihren Gele ist allerdings in beträchtlichem Ausmaß willkürlich und spiegelt häufig die wesentlichen Strukturmerkmale nicht wider. Das räumliche Netzwerk aus den Molekülen eines Proteins unterscheidet sich vom Netzwerk aus den Molekülen jedes anderen Proteins. Die Unterschiede beruhen in erster Linie auf der Individualität der Aminosäuresequenz.

Aminosäurezusammensetzung und -sequenz (Primärstruktur) der Polypeptidkette legen fest, ob eine bestimmte Art der Wechselwirkung auftreten kann. Die Primärstruktur bestimmt ebenso alle höheren Stufen der Proteinorganisation^[9] und damit auch die Fähigkeit der Moleküle, ein dreidimensionales Netzwerk zu bilden – die Basis des Gelzustands.

3. Kollagen und seine Abbauprodukte

Wir werden Gele fibrillärer Proteine hier nicht ausführlich behandeln, da die potentiellen Objekte für industrielle Verarbeitung – Pflanzen- und Einzellerproteine (Biomasse) – nach heutiger Auffassung nicht fibrillär sind. Die Gele von

Kollagen sowie dessen Abbauprodukten, gewöhnlich als Gelatine bezeichnet, sollen jedoch eingehender betrachtet werden. Gelatine war bis vor kurzem das einzige industriell hergestellte Reinprotein und ist auch am genauesten untersucht worden.

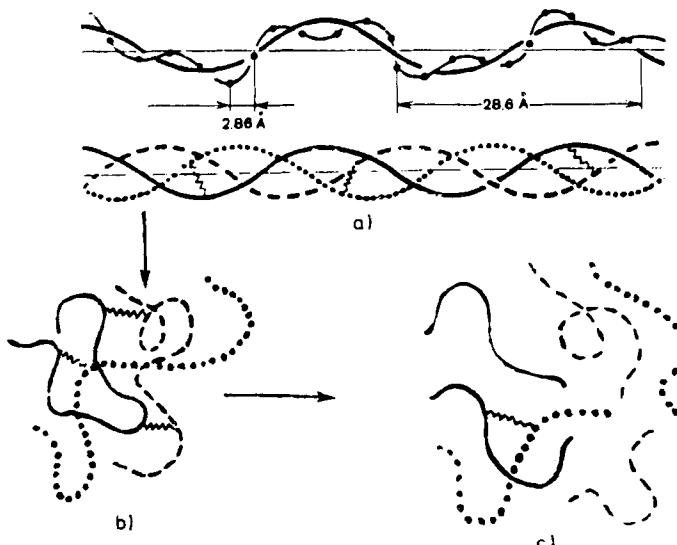


Abb. 1. a) Tripelhelix des Kollagenmoleküls im nativen Zustand, b) thermische Denaturierung und c) hydrolytische Spaltung.

Das Kollagenmolekül besteht aus drei Polypeptidketten, zwei α_1 -Ketten und einer α_2 -Kette. Die drei spiralförmigen α -Ketten winden sich um eine gemeinsame Achse und bilden so eine Tripelhelix (Abb. 1). Während die Aminosäuresequenz der α_1 -Kette aufgeklärt werden konnte (Abb. 2), ist die Entzifferung der α_2 -Kette noch nicht vollständig gelungen; man weiß aber, daß sie sehr stark der Primärstruktur der α_1 -Kette ähnelt^[10]. Die Ähnlichkeit in der Primärstruktur der beiden Ketten, z. B. der Befund, daß jede dritte Aminosäure Glycin ist, ist von größter Wichtigkeit. Dieser hohe Ordnungsgrad der Primärstruktur sichert die Stabilität der tripelhelicalen Struktur des Kollagenmoleküls und die geordnete Zusammenlagerung der Kollagenmoleküle während der Fibrillenbildung. Unter natürlichen Bedingungen lagern sich während der Fibrillenbildung die Kollagenmoleküle in Längsrichtung verschoben aneinander, und zwar um ein Viertel der Moleküllänge (Abb. 3). Diese Verschiebung wird durch die polaren Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureseitengruppen verursacht; die polaren Gruppen sind nicht gleichförmig entlang der Polypeptidkette verteilt, sondern clusterartig konzentriert. Diese räumliche Konzentration polarer Gruppen sichert, zusammen mit der Verschiebung um ein Viertel einer Moleküllänge, die hohe Ortsfestigkeit der Moleküle in den Fibrillen.

Es ist bis jetzt unmöglich zu erklären, wie die Kollagenmoleküle die begrenzte Löslichkeit erreichen, die für die Fibrillenbildung und den Aufbau eines kontinuierlichen Netzwerks notwendig ist. Bekannt ist lediglich, daß die Kollagenmoleküle in einer löslichen Form synthetisiert werden und auf dieser Stufe nicht die typischen Aminosäuren wie Hydroxyprolin und Hydroxylysin enthalten. Die primär gebildeten Moleküle (Tropokollagen) werden durch die interzelluläre Flüssigkeit an die Stelle gebracht, wo das Bindegewebe entstehen soll, und dort enzymatisch oxidiert, vor allem durch Prolin- und Lysin-Hydroxylase. Die Bildung von Hydroxyprolin und Hydroxylysin führt zum Auftreten zu-

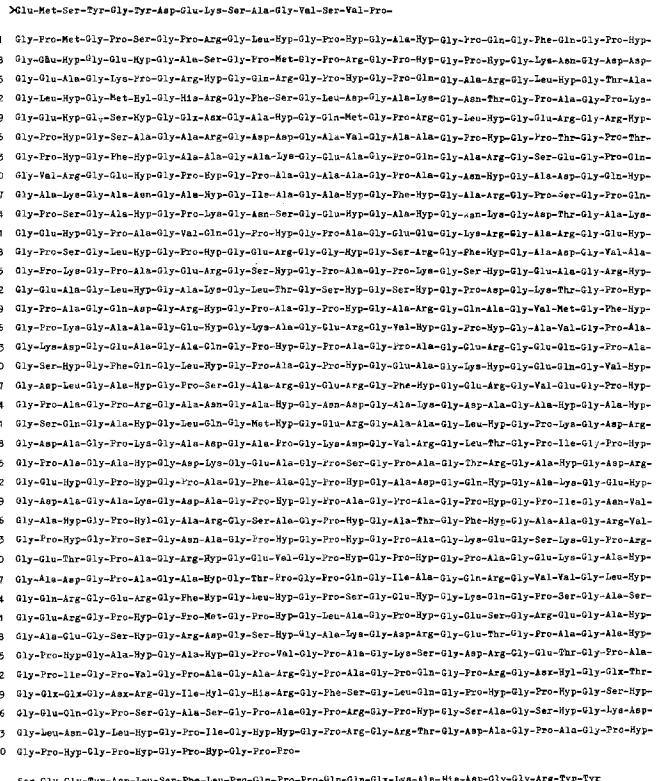


Abb. 2. Primärstruktur der α_1 -Kette des Kollagens.

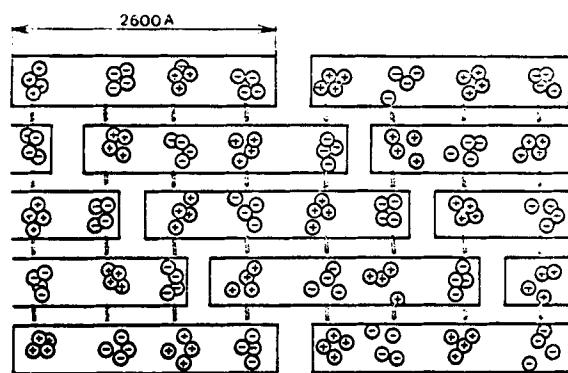
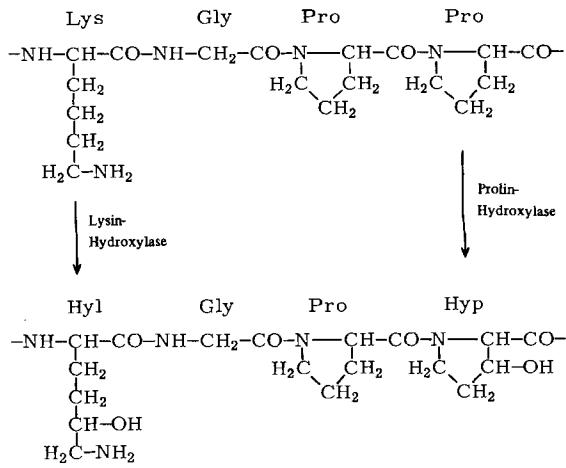


Abb. 3. Anordnung der Kollagenmoleküle in den Fibrillen.

sätzlicher Wasserstoffbrücken (neben denen zwischen Peptidgruppen) und zum Ansteigen der Wechselwirkungsenergie zwischen den Polypeptidketten.



Die Lysinoxidation ist hiermit jedoch noch nicht beendet; vielmehr wird die ϵ -Aminogruppe unter Bildung von 5-Oxonorleucin eliminiert. Die so entstandene Aldehydgruppe reagiert mit unveränderten ϵ -Aminogruppen des Lysins unter Bildung kovalenter Querbrücken. Beteiligen sich an der Vernetzung vier und mehr Aminosäuren, so bilden sich kompliziertere Brücken (Desmosintyp). In Tabelle 1 sind Beispiele zusammengestellt.

räumliche Proteinnetzwerk wird zu einem einzigen Makromolekül.

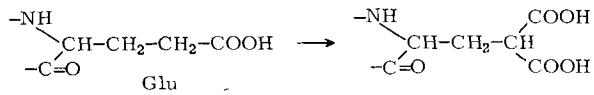
Während der Alterung von Kollagen, die von chemischen Änderungen der Aminosäuren in der Polypeptidkette begleitet ist, wird Glutaminsäure zu einem γ , γ -Dicarboxy-Derivat carboxyliert^[20]. Dieser polypeptidgebundene Chelatbildner fängt Calcium-Ionen ein, was zur Bildung von Calciumbrücken zwischen den Molekülen führt; hierdurch verlieren die

Tabelle 1. Kovalente Querbrücken in Proteinmolekülen.

Neben Lysin bilden auch Glutamin- und Asparaginsäure Querbrücken; dabei entstehen γ -Peptid- (mit Lysin) und Esterbindungen (mit Serin). Die Dityrosin-Querbrücke entsteht bei der Einwirkung von Peroxidasen auf Bindegewebe.

Kovalente Vernetzung tritt nicht nur bei der Reaktion funktioneller Gruppen der Polypeptide ein, sondern auch bei der Verbrückung dieser Gruppen mit polyfunktionellen niedermolekularen Verbindungen, z. B. Aldosen (unter Bildung einer Glykosid- und einer Etherbindung), Aldehyden und Ammoniak (unter Bildung von Amidbrücken)^[19]. Kovalente Brücken entstehen ebenso innerhalb und zwischen Molekülen. Auf diese Weise hört die übermolekulare Struktur des Kollagens auf, übermolekular zu sein, und das gesamte

Fibrillen ihre Flexibilität. Dieser Vorgang ist für das Kollagen von Knorpel-, Sehnen- und Knochengewebe charakteristisch.



Abgesehen vom Beitrag anderer Biopolymere zur Stabilisierung der Kollagenstruktur können vier Arten von Wechselwirkungen unterschieden werden, die die Steifheit der räumlichen Anordnung (vgl. Abb. 4) dieses Proteins bestimmen: Wasserstoffbrücken, polare Wechselwirkungen, Salzbrücken und kovalente Vernetzung. Damit diese Wechselwirkungen stattfinden können, muß das ursprüngliche lösli-

che Tropokollagen in dreifacher Hinsicht verändert werden: 1. Oxidation einiger Aminosäuren, 2. kovalente Vernetzung durch Reaktion der funktionellen Gruppen des Proteinmoleküls und 3. kovalente Vernetzung durch polyfunktionelle niedermolekulare Reagentien.

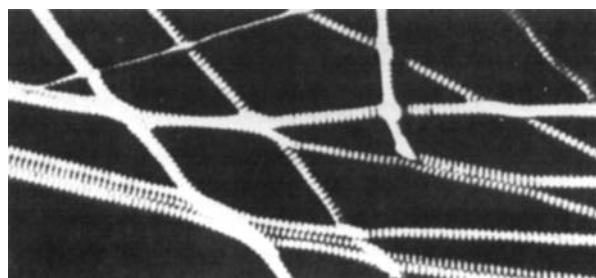


Abb. 4. Menschliches Sehnenkollagen bei 14000facher Vergrößerung.

Die Herstellungsverfahren für Gelatine und die Eigenschaften von Gelatinegelen sind von *Veis*^[21], *Mikhailov*^[19] und *Raikh*^[22] eingehend untersucht worden. Wir wollen hier nur darauf hinweisen, daß es weder durch Wahl des Ausgangsmaterials noch der Behandlungsweise möglich ist, Gelatine mit einer Standard-Zusammensetzung herzustellen. So variieren bei Kollagen, auch bei gleicher Provenienz, der Hydroxylierungsgrad (Lysin/Hydroxylysin- und Prolin/Hydroxyprolin-Verhältnis) und die Anzahl der Vernetzungsstellen. Weiterhin kann man bei der Herstellung der Gelatine aus kollagenhaltigen Materialien nicht standardisieren, in welchem Ausmaß die Kollagenfasern chemisch abgebaut werden: Sowohl die kovalenten Querbrücken als auch die α -Peptidbindungen in der Polypeptidkette werden hydrolysiert (Abb. 1). Als Ergebnis erhält man eine Mischung von Polypeptiden mit annähernd gleicher Aminosäuresequenz und Molekulargewichten von 30 000 bis 40 000. Solche Änderungen in der Gelatinezusammensetzung beeinflussen natürlich die Geleigenschaften.

Die thermische Stabilität von Gelatinegelen unterschiedlichen Ursprungs schwankt jedoch vergleichsweise wenig. In dieser Hinsicht kann Gelatine als eine hinreichend standariserte Substanz angesehen werden. Nach *Bello* et al.^[23, 24] spielen bei der Gelierung von Gelatine die Wasserstoffbrücken, die von den α -Peptidgruppen ausgehen, die dominierende Rolle. Alle anderen Wechselwirkungsarten treten kaum in Erscheinung. Aus diesem Grund können Gelatinegelen bezüglich der thermischen Stabilität als hinreichend einheitlich angesehen werden; für die Polypeptidketten bleibt die Tripelhelix unterhalb von 30 °C die günstigste Struktur. Die Löslichkeit von Gelatine ist jedoch wesentlich größer als die des ursprünglichen Kollagens, und ihr Gelnetzwerk ist thermisch weniger stabil. Das Netzwerk von Gelatinegelen kann entweder durch koordinative Kupplung (Behandeln mit polyvalenten Kationen^[25]) oder durch kovalente Verknüpfung über polyfunktionelle Reagentien^[26] fixiert werden. Auf diese Weise lassen sich nicht-schmelzbare Gelatinegelen erhalten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen^[27] und Bestimmungen der optischen Rotationsdispersion in Gelatinelösungen und -gelen^[28] weisen übereinstimmend darauf hin, daß die Polypeptidketten der Gelatine bei Temperaturerhöhung in Form statistischer Knäuel in Lösung gehen. Beim Abkühlen gehen die Polypeptidketten wieder in den helixförmigen Zustand über, wobei gleichzeitig sphärische Aggregate von Proteinmolekülen auftreten. Diese sphärischen Aggregate lagern sich aneinander, wobei einfache lineare Gebilde mit Verzweigungsstellen entstehen (Abb. 5a). Eine solche Wechselwirkung mit hauptsächlich zwei Kontaktpunkten wird bis zu Proteinkonzentrationen von 12% beobachtet; darüber findet eine statistische Aggregation mit seitlicher Anlagerung der sphärischen Partikel an die linearen Gebilde statt. Dies führt zur Verdickung der Fibrillen und zur Abnahme der Ordnung des Systems. Die Struktureinheit in Gelatinegelen sind also nicht die stäbchenförmigen Tripelhelices, sondern deren sphärische Aggregate. Wenn sich die einfachen linearen Fibrillen bilden, kommen diese sphärischen Aggregate nicht nur an der Oberfläche miteinander in Kontakt; vielmehr werden die Polypeptidketten der assoziierten Proteinpartikel miteinander verflochten. In den Fibrillen, die in Gelatinegelen bei Konzentrationen von 1–12% beobachtet werden, hören die Struktureinheiten auf, als solche zu bestehen (Abb. 5b). Die einzigen Überbleibsel der kugelförmigen Teilchen in den Gelatinefibrillen sind Einschnürungen, die den Eindruck einer transversalen Furchung – ähnlich wie bei den nativen Kollagenfibrillen – vermitteln. Gelatinefibrillen weisen eine geringere Periodizität als Kollagen auf, was auf den wesentlich geringeren Ordnungsgrad bei der Zusammenlagerung der Moleküle zurückzuführen ist. Zunächst einmal enthalten nicht alle ursprünglichen sphärischen Teilchen dieselbe Menge an Protein, was sich in ihrer Größe (600–900 Å) und, daraus resultierend, in der unehelichen Fibrillendicke ausdrückt. Eine gleichmäßige Anordnung der Moleküle in der Gelatine ist aufgrund der Unterschiede im Molekulargewicht nicht möglich; man kann daher die bei nativem Kollagen (Abb. 3) beobachtete Verschiebung um ein Viertel der Moleküllänge nicht erwarten. Eine vollständige Helixbildung wird bei der Gelatine zusätzlich noch dadurch verhindert, daß die Polypeptidketten während des Abkühlens mit großer Geschwindigkeit assoziieren. Auch dadurch verringert sich der Ordnungsgrad des Systems^[29].

Die Vernetzung von Gelatinemolekülen in heißen Lösungen (60 °C) fixiert die Polypeptidketten im Zustand des statistischen Knäuels. Hierdurch bildet sich ein nicht schmelzbares Gel. Zukünftige Untersuchungen solcher Gele können uns vielleicht zeigen, wie ein solches Gelnetzwerk aufgebaut ist, das aus individuellen Polypeptidketten besteht.

Hydrophobe Wechselwirkungen spielen bei der Stabilisierung von Proteinstrukturen allgemein eine wesentliche, bei der Bildung globulärer Strukturen eine dominierende Rolle^[30]. Die hydrophoben Wechselwirkungen unterscheiden sich von den anderen lyophoben Wechselwirkungen da-

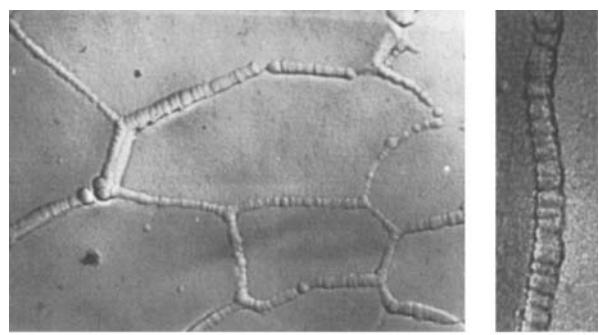


Abb. 5. 2proz. Gelatinegel bei a) 12500facher und b) 50000facher Vergrößerung.

durch, daß ihre energetischen Eigenschaften 1. von Dispersionskräften zwischen den sich berührenden unpolaren Molekülen und 2. von Änderungen in der Struktur des Solvens (Wasser) abhängen, wenn es mit den unpolaren Molekülen Wechselwirkungen eingeht.

Kontakte unpolarer Moleküle mit Wasser erniedrigen die Entropie des Systems, indem der Anteil an geordneten Gebilden im Wasser erhöht wird. Durch die Verringerung solcher Kontakte (Übergang von Molekülen in die unpolare Umgebung oder Assoziation) erhöht sich die Entropie; das System geht in einen energetisch günstigeren Zustand über^[31].

Die hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften der Aminosäuren in der Polypeptidkette wurden von *Tanford*^[32] eingehend untersucht. Nach *Tanford* sind die Seitengruppen von Serin, Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure hydrophil, während diejenigen aller anderen Aminosäuren mehr oder weniger hydrophob sind (von 0 cal/mol für Glycin bis 3000 cal/mol für Tryptophan) und den Kontakt mit Wasser vermeiden müssen.

Die Polypeptidkette ist räumlich so angeordnet, daß die hydrophoben Aminosäuren den globulären Kern bilden und die hydrophilen Aminosäuren sich auf dessen Oberfläche befinden. *Bigelow*^[33] zeigte, daß die räumliche Struktur eines Proteins mit seiner mittleren Hydrophobie zusammenhängt, die eine Kenngröße für das Verhältnis von hydrophoben zu hydrophilen Gruppen in der Polypeptidkette ist. Bei der Berechnung der mittleren Hydrophobie werden nur die Hydrophobie der Aminosäurereste und deren Volumina verwendet; die Lage der Aminosäurereste in der Polypeptidkette wird nicht berücksichtigt. Solch ein Berechnungsweg kann nicht zu allen charakteristischen Eigenschaften der Tertiärstruktur von Proteinen führen, reicht jedoch als erste Näherung aus. Aus *Bigelows* Berechnungen folgt, daß ein Protein eine gewisse mittlere Hydrophobie besitzen muß, damit seine globuläre Tertiärstruktur stabil ist. Bei gleichem Volumen hat die Kugel von allen geometrischen Körpern die kleinste Oberfläche; wenn ein Proteinmolekül in dieser Form vorliegt, benötigt es nur eine minimale Zahl von hydrophilen Gruppen, um den hydrophoben Kern abzuschirmen. Wie sich zeigt, entspricht dieser berechnete „Grenzwert“ für die Hydrophobie der tatsächlichen Form von Proteinmolekülen in Lösung. Bei größerem Überschuß an hydrophoben Gruppen (mittlere Hydrophobie oberhalb des Grenzwertes) reicht die Anzahl der hydrophilen Gruppen nicht mehr aus, um den Kern abzuschirmen. Dies führt zur Assoziation von Molekülen; das Proteinteilchen besteht dann in Lösung aus

mehreren Untereinheiten. Bei einem Überschuß an hydrophilen Gruppen (mittlere Hydrophobie unterhalb des Grenzwertes) kann ein Proteinpartikel in Lösung eine andere Form annehmen als die Kugelform; dabei wird es um so länglicher werden, je größer die Oberfläche ist, die durch hydrophile Gruppen besetzt werden kann.

Aus dem oben Dargelegten ergibt sich damit: Nimmt die Hydrophilie eines Kollagenmoleküls durch Oxidation zu, so wird die Bildung linearer Strukturen und eines molekularen Netzwerks aufgrund von nicht-hydrophoben Wechselwirkungen erleichtert. Zugleich muß die Möglichkeit für das Auftreten hydrophober Wechselwirkungen geringer werden. Einige Autoren weisen darauf hin, daß hydrophobe Kontakte zur Bildung des Gelnetzwerks bei Gelatine beitragen. Die Bindung von Kohlenwasserstoffen durch Gelatine kann als Nachweis dafür gelten, daß sie hydrophobe Bereiche enthält. Die maximale Löslichkeit in Benzol weisen statistisch geknäuelte Gelatinemoleküle auf^[34]. Die Benzollöslichkeit nimmt mit zunehmender Bildung des Gelnetzwerks ab^[35, 36], und die Gelsteifigkeit verringert sich als Folge der Wechselwirkungen mit Benzol. Diese Befunde stimmen mit der Ansicht von *Mikhailov*^[19] überein, wonach eine alternierende Anordnung von hydrophoben und hydrophilen Gruppen in den Polypeptidketten der Gelatine das Auftreten hydrophober Kontakte zwischen den Molekülen während der Bildung des Gelnetzwerks erleichtert. Der Anteil der hydrophoben Wechselwirkungen bei der Bildung der Gelatinestruktur ist jedoch viel kleiner als bei der Bildung der Raumstrukturen globulärer Proteine.

4. Raumstrukturen globulärer Proteine

Globuläre Proteine sind ähnlich den fibrillären befähigt, im wässrigen Medium Gele zu bilden, jedoch nur unter speziellen Bedingungen und bei höheren Konzentrationen. Im Gegensatz zu Gelatine, bei deren Gelbildung das Protein renaturiert wird, geht die Gelbildung nichtfibrillärer Proteine meist mit einer Denaturierung einher. In der Regel denaturiert das Protein, bevor die Proteinteilchen zu linearen Strukturen aggregieren und ein dreidimensionales Gelnetzwerk bilden. *Tombs*^[37] hat die Besonderheiten bei der Aggregation sphärischer Proteinpartikel untersucht, insbesondere, wie der Typ der Aggregation und das Ausmaß der Auffaltung der Polypeptidketten die Struktur des Gelnetzwerks beeinflussen (vgl. Tabelle 2).

Ausgehend von rein geometrischen Betrachtungen berechnete er, daß für die Bildung eines dreidimensionalen Netz-

Tabelle 2. Beziehung zwischen Struktur des Gelnetzwerks und Proteinkonzentration (RSA = Rinderserumalbumin).

Protein-konformation	Aggregations-typ	statistisch			geordnet		
		Netzwerk-typ [a]	ber. [b]	gef. [c]	Netzwerk-typ [a]	ber. [b]	gef. [c]
kompakte Kugel	3	400	18%: α -Casein in saurem Medium 15%: α -Casein in alkalischem Medium		2	40	4%: β -Casein in saurem Medium 3%: RSA nach Erwärmung auf 70 °C
statistisches Knäuel		50	—		5	—	
			8%: RSA nach Erwärmung auf 100 °C				1%: Gelatine 0.5%: Kollagen
aufgefaltete Kette	4	10	—		1	1	—

[a] Netzwerktyp nach Flory (vgl. Abschnitt 2). [b] Nach *Tombs* berechnete Relativwerte (vgl. Abschnitt 4). [c] Im realen System gefundene Werte (in Gew.-%).

werks mit festgelegtem Poredurchmesser bei einem statistisch geknäulten Proteinmolekül eine fünfmal größere Konzentration nötig ist als bei einer ungefalteten Polypeptidkette; für die Bildung einer kompakten Kugel berechnete er eine 40mal größere Proteinkonzentration. *Tombs* betrachtete dann zwei Extremtypen für die Aggregation von Proteinpartikeln bei der Gelbildung, die statistische und die geordnete Aggregation zu einfachen linearen Ketten. Wenn alle übrigen Parameter übereinstimmen, erfordert nach den Berechnungen die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks bei statistischer Aggregation eine 10- bis 12mal höhere Konzentration als bei geordneter Aggregation.

Die Mikrostruktur von Proteingelen ist nur unzulänglich bekannt. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, besteht eine gewisse Übereinstimmung im Gang der experimentellen und der berechneten Werte, wenn auch das quantitative Verhältnis der Proteinkonzentrationen in realen Systemen nicht den Berechnungen von *Tombs* entspricht. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß die Zuordnung eines Gelnetzwerks zu einem bestimmten Typ sehr willkürlich ist, da solche Korrelationen „nach Augenschein“ durchgeführt werden. Hinzu kommt, daß die Daten über das Ausmaß der Auffaltung von Polypeptidketten nur halbquantitativ sind und der Ordnungsgrad eines Systems sogar nur qualitativ abgeschätzt werden kann. Es erscheint ratsam, in Zukunft die Anzahl der Kontakte von Netzstellen untereinander zu berücksichtigen (d. h. die Koordinationszahl). Die geordnete Aggregation wäre durch eine Koordinationszahl von wenig mehr als zwei charakterisiert. Die Erhöhung der Koordinationszahl entspricht der Abnahme des Ordnungszustands des Systems.

Eine definitive Aussage kann über Gele getroffen werden, deren Netzwerk aus kompakten sphärischen Teilchen aufgebaut ist. Für solche Systeme können die Gele einiger Lactoproteinfaktionen als Beispiel dienen. Casein, die Hauptproteinkomponente der Milch, ist ein Phosphoprotein und besteht aus mindestens 25 Fraktionen^[38]. Die Hauptmenge bilden die α -Fraktion (bis zu 60%) und die β -Fraktion (bis zu 35%). Die beiden Fraktionen unterscheiden sich nur geringfügig im Molekulargewicht (23600 bzw. 24000) und in der Aminosäurezusammensetzung. Der wichtigste Unterschied besteht in der Aminosäuresequenz und im Phosphorylierungsgrad^[39, 40]. Ein sphärisches Aggregat von Molekülen (Micelle) erwies sich als Struktureinheit des Caseins und seiner Fraktionen in Lösungen, Gelen und Filmen.

Optische Rotationsdispersion und Elektronenmikroskopie^[41] zeigen, daß die sphärischen Partikel des α - und β -Caseins im sauren Medium ohne irgendwelche Konformationsänderungen aggregieren. Das ist ein Phänomen, für das es nur ein weiteres Beispiel gibt: β_{A} -Lactoglobulingle^[42], deren Struktur allerdings nicht genau bekannt ist. Ab einer Konzentration von 4% bildet β -Casein im sauren Medium Gele, wobei die Aggregation zum Netzwerk sehr geordnet verläuft (Abb. 6a). Bis zu einer Konzentration von 8% ändert sich die Morphologie der Gele nicht: Es werden einfache, verzweigte Ketten aus Micellen beobachtet. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt die Zahl der Knotenpunkte im Netzwerk zu. Während der Aggregation ändern die sphärischen Partikel ihre Konformation nicht, sie bewahren ihre Individualität und berühren sich nur an den Oberflächen (Abb. 6b). Eine solche geordnete Aggregation ist nur möglich, wenn die Stellen, von denen Wechselwirkungen ausgehen, an der

Oberfläche der sphärischen Teilchen in einigen wenigen (wahrscheinlich zwei polaren) Zonen angeordnet sind.

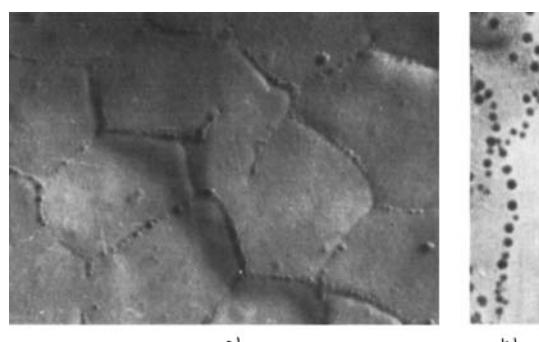


Abb. 6. 4proz. β -Caseingel im sauren Medium a) eingefroren und angefärbt, 12500fach vergrößert und b) mit Phosphorwolframsäure kontrastiert, 50000fach vergrößert.

Im Gegensatz zum β -Casein weist α -Casein keine definierte Anordnung der Stellen auf, von denen Wechselwirkungen ausgehen, oder aber sie treten sehr viel häufiger auf. Die Aggregation der α -Casein-Kügelchen ist demnach ein statistischer Vorgang. Die geringste Konzentration, bei der α -Casein im sauren Medium geliert, beträgt 18% (Tabelle 2). Selbst bei dieser Konzentration besteht das Gelnetzwerk aus aufgeweiteten globulären Aggregaten (Abb. 7a). Wenn die Proteinkonzentration ansteigt, nimmt die Dicke der Fibrillen aufgrund der lateralen Anlagerung der Kügelchen zu, während die Konzentration der Knotenpunkte im Netzwerk abnimmt.

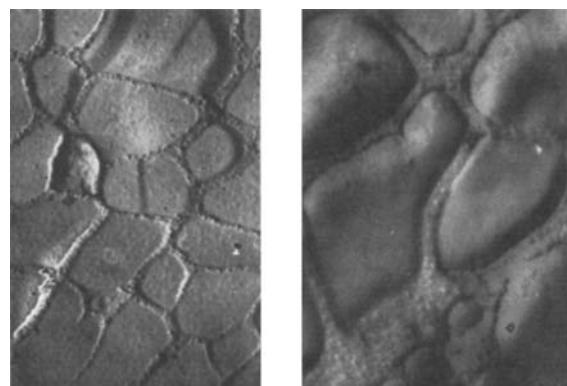


Abb. 7. α -Caseingel a) 18proz. in saurem Medium, 12500fach vergrößert und b) 15proz. in alkalischem Medium, 25000fach vergrößert.

Auch im alkalischen Milieu ist die Aggregation der α -Casein-Kügelchen ein statistischer Vorgang (Abb. 7b), jedoch ändert sich die Konformation der Proteinmoleküle ganz beträchtlich und nähert sich der des statistischen Knäuels. Das Netzwerk besteht zwar noch aus sphärischen α -Casein-Teilchen, doch sind diese weniger eindeutig abgegrenzt. Man beobachtet eine Verformung der Teilchen, weiterhin können sie Masse austauschen, und die Peptidketten können einander umschlingen, wenn sich das Netzwerk bildet. In dem Maße, wie sich die Micellen auffalten, sinkt die für eine Gelierung notwendige Konzentration und erreicht 15%. Diese Konzentrationsänderung ist viel kleiner als man sie nach *Tombs* erwarten sollte, wahrscheinlich weil die α -Casein-Teilchen unter Gelierungsbedingungen noch weit vom Zustand des statistischen Knäuels entfernt sind.

Rinderserumalbumin (RSA) aggregiert beim Erhitzen aufgrund der Bildung von Disulfid-Querbrücken^[43,44]. Durch Variation der Bedingungen erhält man völlig verschiedene Typen der Aggregation und infolgedessen unterschiedliche Systeme – von Gelen mit kontrollierten mechanischen Eigenschaften bis zu amorphen Koagulaten. Das RSA-Molekül enthält eine beträchtliche Anzahl von Disulfid- und Mercaptogruppen. Beim Erhitzen bis auf 69 °C ändert sich die Konformation nur geringfügig. Es werden nur wenige SH-Gruppen einer intermolekularen Verbrückung zugänglich, und RSA aggregiert, wie von *Tombs*^[44] vorgeschlagen, mehr oder weniger geordnet zu einem Gelnetzwerk. Erhitzt man bis auf 100 °C, falten sich die Polypeptidketten vollständiger auf. Die Zahl der Stellen, von denen Wechselwirkungen ausgehen, nimmt zu, und die Aggregation verläuft statistisch. Da bei einer solchen Aggregation die für die Bildung eines Gelnetzwerks nötige Proteinkonzentration größer ist als die Löslichkeit von RSA (7%), kommt es zur Ausflockung und Phasentrennung.

Über die Existenz von Proteingelen mit der Konformation eines statistischen Knäuels gibt es keine zuverlässigen Angaben. Wir können Beispiele für die Proteingelierung anführen, bei der sich die Konformation von der Kugel zum Knäuel oder vom Knäuel zur aufgefalteten Polypeptidkette ändert. So tritt bei der Gelierung von Gelatine ein Knäuel/Helix-Übergang auf^[28]. Im Kollagengel gibt es praktisch keine ungeordneten Bereiche der Polypeptidketten, im Gelatinegel liegen wahrscheinlich einige Bereiche in diesem Zustand vor. Darum haben wir Gelatine in Tabelle 2 unterhalb des „statistischen Knäuels“ angeordnet. Kollagen ist oberhalb der „aufgefalteten Kette“ angeordnet, da ein Gelnetzwerk nicht aus individuellen Polypeptidketten besteht, sondern aus verlängerten tripelhelicalen Molekülaggregaten.

Wir sind davon überzeugt, daß reale Gelsysteme eine viel stärker ausgeprägte Mikrostruktur haben, als die zur Zeit gebräuchlichen Einteilungen nahelegen. Die Voraussagen, die mit diesen Einteilungen getroffen werden können, sind zwar sehr nützlich, jedoch noch weit davon entfernt, quantitativ zu sein.

Von großem Interesse ist die Frage, warum sich bei der Aggregation sphärischer Teilchen ein kontinuierliches Gelnetzwerk bildet. 1970 schrieb *Tombs*^[44], daß eine statistische Aggregation zu mehr oder weniger sphärischen Teilchen führen muß, und eine Gelierung somit nur bei orientierter Aggregation möglich ist. Das Auftreten von Fibrillen glaubte er mit dem autokatalytischen Effekt während der Aggregation von Kugeln erklären zu können, d. h. damit, daß die Wachstums geschwindigkeit der Fibrillen ihrer Länge proportional ist und die Wachstumszentren sich an den Enden der asymmetrischen Aggregate befinden. *Tombs* verweist auf Berechnungen von *Joly* et al.^[45], die gezeigt haben, daß ein solcher Effekt ein allgemeines Phänomen bei der Aggregation globulärer Proteine ist und gut für die Erklärung der Fibrillenbildung herangezogen werden kann.

1974 weist *Tombs*^[37] jedoch darauf hin, daß die wahrscheinlichste Gestalt eines Aggregates, das sich aufgrund statistischer Wechselwirkungen zwischen sphärischen Teilchen bildet, ein Ellipsoid ist. Dieses Ellipsoid dient als Keim für lineare Strukturen und für das dreidimensionale Netzwerk.

In einem realen System scheint eine vollständig statistische Aggregation unwahrscheinlich zu sein, denn dies setzt voraus, daß die sich zusammenlagernden Teilchen an jeder

Stelle ihrer Oberfläche die gleichen Eigenschaften haben. Die Oberfläche von Proteinkügelchen ist in der Regel mosaikartig strukturiert, d. h. es gibt Stellen, die sich in Ladungsdichte und -vorzeichen sowie im Ausmaß der Hydrophobie, im Vorkommen von Mercaptogruppen usw. unterscheiden. Das führt zu einer gewissen Ausrichtung, die auf die Wechselwirkung der Kügelchen zurückgeht. Jede Zunahme in der Ausrichtung der Aggregation erleichtert indes die Schaffung fibrillenartiger Strukturen und damit eines dreidimensionalen Netzwerks.

Bei der Aggregation globulärer Proteine im Gelnetzwerk treten die gleichen Arten der Wechselwirkung auf, die wir bereits beim Kollagen angeführt haben (kovalente Vernetzung, polare Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen). Allerdings spielen die hydrophoben Wechselwirkungen eine viel größere Rolle als beim Kollagen. Im folgenden Abschnitt wird diskutiert, wieweit diese Wechselwirkungen zur Bildung des Gelnetzwerkes beitragen.

5. Gelbildung globulärer Proteine; Wechselwirkungen im Gelnetzwerk

Bei der Betrachtung der Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen im Gelnetzwerk sollten wir keinen der oben erwähnten fünf Typen auslassen, denn das dreidimensionale Netzwerk wird durch Zusammenwirken aller Typen aufgebaut. Es gibt allerdings Systeme, in denen die eine oder andere Wechselwirkung vorherrscht.

Die Gelbildung globulärer Proteine durch physikalische Aggregation findet in der Regel dann statt, wenn die Kügelchen denaturieren und wenn das Protein im System nur begrenzt löslich ist. Thermisch reversible Gele erhält man deswegen nur bei speziellen Werten der Ionenstärke, der Dielektrizitätskonstante des Mediums, speziellen pH-Werten usw. Thermisch irreversiblen Gele können sich dagegen in einem weiteren Bereich bilden.

Eine Glycinin-Lösung^[37] z. B. giert bei Raumtemperatur nach Zugabe von Harnstoff und Alkohol (Glycinin ist ein Sojabohnen-Protein). Das hierbei aufgrund physikalischer Wechselwirkungen gebildete Gel schmilzt reversibel bei 60 °C. Wird die Schmelze auf 80 °C erhitzt, entsteht durch kovalente Vernetzung ein thermisch irreversibles Gel. Dieses Gel bildet sich sogar in Abwesenheit von Harnstoff oder Alkohol.

Kovalente Wechselwirkungen sind in erster Linie für Proteine bedeutsam, die größere Mengen an Cystein enthalten und somit Disulfidbrücken bilden können. Querbrücken sind aber auch bei anderen Proteinen möglich (Tabelle 1)^[46,47].

5.1. Kovalent vernetzte Gele

Eine charakteristische Eigenschaft von Sojaproteinen ist ihre Fähigkeit, sich beim Denaturieren selbst zu strukturieren und gelartige Systeme zu bilden. Diese Eigenschaft wird in großem Maße für die Herstellung künstlicher Produkte auf der Basis von Sojaproteinlösungen oder -dispersionen ausgenutzt. Nach *Aoki* und *Sakurai*^[48] sowie *Wolf*^[49] geht dieses Phänomen hauptsächlich auf die Bildung intermolekularer Disulfidbindungen zurück, obwohl nicht ausge-

schlossen werden kann, daß auch nichtkovalente Wechselwirkungen an der Gelbildung beteiligt sind. Die Gültigkeit dieser Auffassung belegen die Autoren mit der thermischen Irreversibilität der Gele und dem Einfluß von Zusätzen. Oxidationsmittel beschleunigen die Gelbildung, während Reduktionsmittel (z. B. Cystein, Sulfite) die Strukturierung behindern und die mechanische Festigkeit der Gele erniedrigen. Nach *Saio* et al.^[50] bilden Sojabohnenfraktionen mit hohen Anteilen an schwefelhaltigen Aminosäuren festere Gele.

Eine Denaturierung des Sojaproteins, bei der sich das Gel durch Entstehung kovalenter Disulfid-Querbrücken bildet, tritt normalerweise beim Erhitzen von Dispersionen oder Lösungen auf^[51, 52]. Das Gefrieren von Sojaprotein-haltigen Lösungen führt zum gleichen Ergebnis^[53]. Hierbei beruht die Denaturierung auf dem Wachstum von Eiskristallen, wodurch die Proteinmoleküle deformiert werden, sowie dem Auftreten von Regionen mit hoher Proteinkonzentration (ungefrorene Lösung) und niedriger Proteinkonzentration (Eiskristalle).

Die kovalente Quervernetzung über Disulfidbrücken ist für die Denaturierung der meisten Proteine mit Mercaptogruppen von größter Bedeutung.

Bei der bereits erörterten Assoziation von Rinderserumalbumin (RSA) spielen Disulfid-Querbrücken die Hauptrolle. Für α -Casein gibt es Angaben über die Möglichkeit der intermolekularen Quervernetzung durch Disulfidbrücken^[54]. *Jones* et al.^[55] nehmen an, daß für die rheologischen Eigenschaften der Weizenproteine im Gelzustand die Disulfidbindungen wesentlich sind.

Bei Gelen, die zur Ernährung dienen, wird der Gehalt an Disulfidgruppen häufig genau überwacht. Wird Hartweizenvollmehl mit Reduktionsmitteln für die Disulfidgruppen (Cystein, Glutathion, Sulfite und deren Mischungen) versetzt, so sinkt die Viskosität des Teiges. Dadurch läßt sich beim Kneten, Extrudieren und Trocknen von Teigwaren Energie sparen^[56, 57] und die Qualität von Backwaren steuern^[58, 59].

Gibt man ins Kochwasser von Reis ein Oxidationsmittel (KIO_3), so wird weniger Protein extrahiert, und der Reis bleibt körniger. *Shintaro* und *Katsuharu*^[60] erklären dies durch eine Umwandlung von Mercaptogruppen in intermolekulare Disulfidgruppen. Eine eindeutige Interpretation ist allerdings schwierig, da die Polysaccharide im Reis möglicherweise zu Dialdehyden oxidiert werden können, die dann mit dem Protein reagieren.

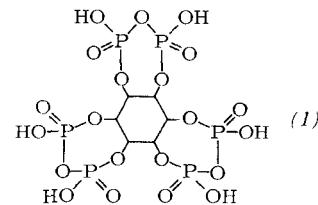
Bei der Hitzebehandlung von Proteinen können sich zusätzlich zu den intermolekularen Disulfidbindungen noch alle anderen Typen kovalent gebundener Querbrücken bilden (vgl. Tabelle 1). Proteine mit hohem Lysingehalt zeichnen sich besonders durch die Bildung von Querbrücken vom Desmosin- und Lysinoalanintyp aus^[61].

Die oben angeführten Vorgänge kann man als Autovulkanisation oder Selbststrukturierung von Proteinsystemen bezeichnen. Mehrere Autoren^[62, 63] glauben, daß die Bildung von Disulfidbindungen den biologischen Wert des Proteins nicht signifikant senkt; die anderen oben erwähnten Querbrückentypen verändern aber nicht nur die rheologischen Eigenschaften grundlegend, sondern verschlechtern auch den Nährwert.

Viele Proteine zeigen eine Selbststrukturierung, aber nicht immer unter technisch vorteilhaften Bedingungen. Um die Proteine zu strukturieren und die thermomechanischen Ei-

genschaften des Proteingels zu steuern, fügt man deshalb Vernetzungsmittel hinzu. Zur Strukturierung pflanzlicher Proteine ist Schwefel verwendet worden^[64], und zwar in Mengen von 0,1 bis 3% bezogen auf das Protein. Die Paste mit 25–30% Protein wird nach Zugabe von fein dispergiertem Schwefel unter Druck in 2 min auf 170 °C erhitzt. Nach dem Entspannen und Abkühlen erhält man ein texturiertes Produkt, das sich als Kunstfleisch eignet. Die hierbei ablaufenden Prozesse lassen sich noch nicht erklären; man kann aber eine Analogie zur Vulkanisation von synthetischen Polymeren mit Schwefel sehen.

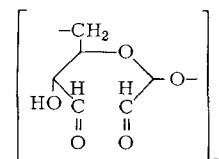
Saio et al.^[50] haben gezeigt, daß Phytinsäure (1) und ihre Salze, die in allen Hülsenfrüchten vorkommen, an der Strukturierung von Sojaproteinen beteiligt sind. Phytinsäure ist zur Gelierung von Milch vorgeschlagen worden^[65]. Hierzu wird entrahmte Frischmilch mit einem Proteingehalt von 3–4% nach Zugabe von 8–15 mmol eines Alkalimetallsalzes der Phytinsäure bei $\text{pH} = 6.1–7.5$ auf 85 °C erhitzt.



Im Mehl von Weichweizen sind Proteine mit einem geringeren Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren als im Mehl von Hartweizen enthalten. Wenn dieses Mehl für die Herstellung von Teigwaren verwendet wird, muß man Vernetzungsmittel zusetzen, um dem fertigen Produkt die gewünschten rheologischen Eigenschaften zu geben. Es ist vorgeschlagen worden, oxidierte Polysaccharide, insbesondere Dialdehydstärke^[66], zum gekneteten Teig zuzufügen.

Dialdehydpolysaccharide sind polyfunktionelle Vernetzer, die mit den Seitengruppen von Cystein, Lysin und Arginin reagieren können. Dialdehydsaccharide werden verwendet, um die Faserstruktur von Proteinlösungen während des Verrippens zu fixieren^[67].

Man hat auch vorgeschlagen, Dialdehydstärke für die Herstellung von Proteingelen mit eingestellten Eigenschaften



zu verwenden^[68]. Die Gele bilden sich in einem weiten pH- und Konzentrationsbereich, wenn man den Proteinlösungen oder -dispersionen 0,5–5% Dialdehydstärke hinzufügt.

Versuchsweise sind auch niedere Aldehyde und Dialdehyde für diesen Zweck verwendet worden. *Dürr* und *Neukom*^[69] haben geprüft, welchen Einfluß die Zugabe von Formaldehyd, Acetaldehyd, Propanal, Hexanal, Glyoxal, Glutaraldehyd, α -Hydroxyadipinaldehyd usw. zu Mehl auf die Eigenschaften von Teigwaren hat. Alle untersuchten Aldehyde gaben den Teigwaren eine höhere Festigkeit und verhinderten, daß während des Kochens Proteine extrahiert wurden. Mit Dialdehyden verfärbte sich das fertige Produkt rötlich-braun. Auch Aldosen werden als Vernetzungsmittel verwendet, und zwar für die Herstellung von Proteingelen^[70].

Die Vernetzung von Proteinen mit niederen Aldehyden wird bei der Herstellung eßbarer Wursthäute sowie eßbarer Umhüllungen für Mischungen verwendet, die mit Fischproteinen angereichert sind^[71]. Diese Filme sind für Wasser und heißes Öl durchlässig. Sie werden hergestellt, indem man die Proteinlösung durch einen Circularextruder in ein Fällbad mit einer 0.01- bis 0.1proz. Lösung eines Aldehyds (Formaldehyd, Acetaldehyd, Glutaraldehyd usw.) bei einem pH-Wert von etwa 6.5 gibt. Der Film verbleibt in dieser Lösung ungefähr 10 min. Er wird dann bei pH=8-11 mit einer 5proz. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, um die Querbrücken zu fixieren und nicht umgesetzten Aldehyd zu entfernen, und anschließend getrocknet.

Auch zur Herstellung und Stabilisierung technischer Proteingele und -filme für die Gerberei und Pelzveredlung werden Aldehyde verwendet^[72-74]. Viele der hier benutzten Vernetzungsmittel sind potentiell toxisch. Während ihr Gebrauch für technische Zwecke noch gerade gerechtfertigt ist, läßt sich ihre Unschädlichkeit bei der Verwendung in Nahrungsmitteln bezweifeln. Mit Formaldehyd behandelte Proteine^[75] werden als Viehfutter benutzt. Umfassende Angaben über die Toxizität sowie den Nährwert aldehydhaltiger Proteinprodukte für den Menschen fehlen noch. Damit der Nährwert eines Proteinmoleküls so weit wie möglich erhalten bleibt, darf es sich bei der Behandlung chemisch nur minimal verändern. Aus dieser Sicht sind diejenigen Gele als Nahrungsmittel vielversprechend, die sich durch physikalische Assoziation bilden. Allerdings benötigt man für ihre Herstellung Medien mit ausgewählten spezifischen Eigenschaften, und zudem sind sie technisch schwieriger zu handhaben.

5.2. Gelbildung über Salzbrücken

Bis vor kurzem konnte man nur alkalische Gele des Caseins; konzentrierte alkalische Caseinlösungen sind im Zusammenhang mit der Untersuchung von Klebstoffen (die auf solchen Lösungen basieren) intensiv studiert worden. *Fidney*^[76] hat als erster gezeigt, daß man bei pH>11.5 Caseingele erhalten kann. Systeme, die bei niedrigeren pH-Werten gebildet werden, sind hochviskos, aber nicht steif. Fügt man Ionen zweiwertiger Metalle hinzu, so kommt es zur reversiblen Gelierung^[77]. Caseingele, die in Gegenwart von Ca(OH)₂ entstanden sind, verhalten sich zwischen pH=11.5 und 12.5 thermisch reversibel^[78]. Für die Verwendung in Nahrungsmitteln sind Caseingele interessant, die sich im neutralen Medium bilden. *Anson* und *Pader*^[79] haben eine Methode vorgeschlagen, mit der man thermisch irreversible Calciumcaseinatgele bei pH=6.0 erhält. Dabei wird das Casein aus der Lösung mit einem löslichen Calciumsalz bei pH=6.5 ausgefällt und eine 25proz. wäßrige Suspension des frisch gefällten Calciumcaseinats im Autoklaven auf 120-125 °C erhitzt.

Die Frage, warum sich ein dreidimensionales Gerüst aus Caseinmolekülen in konzentrierten Gelen bildet, ist von großem Interesse. Nach *Rose*^[80] spielen in Gegenwart von Calcium-Ionen Salzbrücken die wesentliche Rolle: Entfernt man das Calcium aus der Milch, nimmt die Proteinaggregation stark ab, und die Gerinnung ist verzögert. Auch *Payens*^[81] nimmt an, daß Calcium-Ionen, die mit den Carboxy- und Phosphorsäuregruppen des Caseins reagieren, sich

auf der Oberfläche der Caseinmicelle befinden und die Wechselwirkungen der Micellen untereinander verursachen.

Kalab et al.^[82,83] haben eine Methode für die Herstellung von Gelen aus Magermilchpulver beschrieben. Die Trockenmilch wird in so viel destilliertem Wasser suspendiert, daß die Proteinkonzentration über 17% beträgt. Diese Suspension wird in eine Wursthaut gefüllt und 10 min in kochendes Wasser gehalten. Ist das Medium schwach sauer oder neutral, so werden die Calcium-Ionen vom Protein fest gebunden und diffundieren nicht in das kochende Wasser. Das Gel bildet sich in der Hauptsache durch Salzbrücken, doch treten auch Wechselwirkungen zwischen Lactose und Protein auf. Sie finden insbesondere in den Außenschichten statt, die mit dem kochenden Wasser in Kontakt stehen. An der Bildung des Gelnetzwerks sind also auch kovalente Querbrücken beteiligt, wie sie für die Reaktion von Aldosen mit Proteinen charakteristisch sind. Diese beiden Typen von Wechselwirkungen verursachen die spontane Gerinnung, wenn Kondensmilch auf höherer Temperatur gehalten wird. *Kirschmeier*^[84] hat gezeigt, daß man einen ähnlichen Prozeß speziell dadurch herbeiführen kann, daß man auf einen Proteingehalt von über 15% konzentrierte Vollmilch erhitzt.

Durch Zugabe von Calcium- und Magnesium-Ionen läßt sich nicht nur die Löslichkeit und Gelierung von Milchproteinen steuern, sondern auch die von pflanzlichen Proteinen^[85]. Im Gegensatz zu den Ionen von Metallen der 2. Hauptgruppe vermindert eine Zugabe von zweiwertigen Eisen-Ionen die Löslichkeit von Proteinen stark und bewirkt deren Ausfällung^[86]. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, daß die vom Magnesium und Calcium ausgehenden Wechselwirkungen gerichtet sind, und zwar auf die proteingebundenen Carboxygruppen. Eisen koordiniert demgegenüber mit einer viel größeren Zahl von Liganden: Carboxy-, Mercapto-, Disulfid-, α -Peptidgruppen usw. In Gegenwart von Eisen ist die Aggregation von Proteinpartikeln daher weniger gerichtet; die Aggregation verläuft statistisch, und das Protein fällt aus.

5.3. Gelierung als Ergebnis physikalischer Wechselwirkungen

Izmailova et al.^[87,88] haben sich mit der Gelierung von Casein im alkalischen Medium beschäftigt. Sie konnten zeigen, daß sich bei einer Proteinkonzentration von weniger als 15% und einem pH-Wert unter 10.5 keine Gele bilden. Eine Raumstruktur mit maximaler Steifheit erhält man zwischen pH=12.9 und 13.3. Bei pH=13.3 nimmt die Steifheit mit der Zeit ab, offensichtlich wegen der Hydrolyse des Proteins. Die Autoren vermuten, daß intermolekulare Wasserstoffbrücken und hydrophobe Bindungen am Gelierungsprozeß teilhaben, Disulfid-Querbrücken jedoch keine Rolle spielen. Für die Assoziation globulärer Proteine sind in vielen Fällen hydrophobe Kontakte von Bedeutung. Nach *Payens*^[81] liegen die hydrophoben Teile der Peptidketten sowohl im Innern als auch auf der Oberfläche der Caseinmicelle. Die intramikellaren hydrophoben Wechselwirkungen stabilisieren die sphärische Form der Micelle und machen sie außerordentlich widerstandsfähig gegenüber denaturierenden Einflüssen. Die hydrophoben Zentren auf der Oberfläche bewirken eine Assoziation, sogar in Abwesenheit von Calcium-Ionen.

Die bedeutende Rolle der hydrophoben Kontakte bei intermolekularen Wechselwirkungen in Milchproteinen wird durch Befunde von *Thompson* et al.^[89] bestätigt. Die Hauptfraktionen des Caseins enthalten am C-terminalen Ende der Peptidkette hydrophobe Aminosäuren. Wenn Carboxypeptidasen auf α -Casein einwirken, werden Tryptophan und Leucin abgespalten, bei β -Casein sind es Valin und Leucin. Die Fähigkeit dieser Proteine zur Assoziiierung nimmt sehr stark ab, nachdem das Enzym eingewirkt hat.

Die physikalischen Parameter des hydrophoben Kerns von globulären Proteinen ähneln etwa denen von Ethanol^[90]. Die Zugabe von hydrophilen organischen Lösungsmitteln zur Proteinlösung stört die hydrophoben Wechselwirkungen, da sich die Struktur des Wassers verändert, und erleichtert eine Auffaltung des kompakten Proteinmoleküls. So gelieren Hefeprotein-Lösungen, wenn sie in Gegenwart organischer Solventien erhitzt werden^[91].

Die Proteinmoleküle werden ebenfalls aufgefaltet, wenn Harnstoff zur Lösung gegeben wird. Er löst die Wasserstoffbrücken und die hydrophoben Bindungen. Dies tritt auch in stark sauren oder alkalischen Medien ein, weil die gleichnamig geladenen ionischen Gruppen im Proteinmolekül einander abstoßen.

Jrgenson^[92] hat denaturierte Ovalbumin gele in Mischungen aus Wasser und *n*-Propylalkohol untersucht. Der Alkohol wirkt in diesen Systemen als Denaturierungsmittel und als Lösungsmittel, das das Ausfallen des Proteins verhindert. Gele bilden sich nur, wenn die Alkoholkonzentration 40 bis 60% beträgt. Außerhalb dieses Bereiches fällt das Protein aus. Eine Gelbildung tritt bei Ovalbumin ab Konzentrationen von 2% auf; bei niedrigeren Konzentrationen nimmt nur die Viskosität der Lösungen zu. Gele aus 2% Ovalbumin in 50% *n*-Propylalkohol schmelzen reversibel bei ungefähr 67 °C.

Myers und *France*^[93] verdünnten eine 5proz. Ovalbuminlösung so mit wäßriger Essigsäure, daß ein System mit 1% Protein und 3% Säure entstand. Fügt man bei 25 °C NaCl in Konzentrationen bis zu 0.6 mol/l hinzu, so werden die Geschwindigkeit der Gelierung und die Steifheit des Gels erhöht. Bei höheren NaCl-Konzentrationen setzt sich das Protein ab. *Donnelly*^[94] hat Ovalbumin gele erhalten, indem er die Proteinlösung mit Alkali versetzte. Diese Gele werden mit steigendem pH-Wert leichter verflüssigt. Nach *McKenzel* et al.^[95] senkt die Zugabe von Harnstoff die Alkalimenge, die für die Gelierung nötig ist. *Jaenike*^[96] konnte durch Zusatz von Harnstoff Ovalbumin gele im pH-Bereich 4.7–10.8 erhalten. Unter hohem Druck denaturiert Ovalbumin auch in neutraler Lösung und bildet ein Gel^[97].

Bulankin et al.^[98] ziehen den Schluß, daß die Gele beim Ovalbumin ohne Beteiligung von Disulfidbindungen entstehen und die Gelbildung ein rein physikalischer Vorgang ist. Untersuchungen von *Izmailova*^[99, 100] über den Verlauf der Gelierung von Ovalbumin bei $\text{pH} < 3$ und > 10 sind mit dieser Schlußfolgerung in Einklang: Die minimale Konzentration für die Gelierung des Ovalbumins beträgt im sauren Medium 2% und im alkalischen Medium 3.5%. In Ovalbumin sind in der Hauptsache hydrophobe Kräfte wirksam. Das zeigt sich, wenn man den Gele Substanzen zufügt, die selektiv die eine oder andere Wechselwirkung aufheben können, sowie durch die zunehmende Steifheit des Gels beim Erwärmen bis 55 °C.

Das Auftreten hydrophober Wechselwirkungen wird erleichtert, wenn die Ionenstärke in einem System ansteigt: Gerade in Gegenwart von Alkalimetallsalzen gelieren viele Proteine. Eine Gelierung von Lactoglobulin-Mischungen wurde beobachtet, wenn zu Magermilch bei $\text{pH} = 6.8$ Kaliumphosphat in einer Konzentration bis zu 0.1 mol/l gegeben wurde^[101]. Es ist bemerkenswert, daß kein Anion außer Phosphat – auch nicht Glycerophosphat – eine Gelierung verursacht. β -Lactoglobulin geliert^[40], wenn eine Lösung mit 4–5% Protein und 50% Ammoniumsulfat auf $\text{pH} = 4.6$ angesäuert wird (siehe Abschnitt 4). Entfernt man das Ammoniumsulfat durch Dialyse, so verflüssigt sich das Gel. Das Protein geht hierbei in Lösung, ohne sich chemisch oder konformativ zu ändern.

Durch Zugabe von Natriumchlorid kann man die Gelierungszeit und die Steifheit von Ovalbumin^[93] und Arachin-gele^[102, 103] steuern (Arachin ist ein Erdnuß-Protein). Ein Arachin-gele erhält man, wenn man eine 15proz. Proteinlösung bei $\text{pH} = 5.6$ auf 110 °C erhitzt oder wenn man den pH-Wert bei Raumtemperatur von 12 auf 4 erniedrigt.

Das Gleichgewicht zwischen hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen sowie die Löslichkeit globulärer Proteine werden auch durch die chemische Modifizierung der Proteinmoleküle gesteuert. Durch kontrollierte Partialhydrolyse kann sich das Proteinmolekül auffalten, womit eine Aggregation verbunden sein kann. Werden Caseinlösungen mit Rennin behandelt, so wird der hydrophile Anteil der α -Fraktion abgespalten. Die α -Fraktion enthält einen hydrophoben Polypeptid- und einen hydrophilen Polysaccharidteil und weist damit oberflächenaktive Eigenschaften auf. Sie schirmt den hydrophoben Kern der Caseinmicelle ab und hält diese in Lösung. Der Verlust des hydrophilen Molekülteils führt dazu, daß die desorganisierten Komponenten der Caseinmicelle aggregieren. Es kommt zum Ausflocken des Proteins und zur Phasentrennung im System^[104, 105]. An dieser Stelle sei daran erinnert, daß im Gegensatz hierzu das Abspalten der hydrophoben Aminosäuren von α - und β -Casein die Aggregation verhindert und die Löslichkeit erhöht^[89].

Eine Partialhydrolyse des Sojaproteins verbessert dessen Fähigkeit zu gelieren und ermöglicht es, die Eigenschaften des Gels einzustellen. Dazu wird das Protein mit Säure, Alkali^[106] oder proteolytischen Enzymen pflanzlichen Ursprungs^[107, 108] behandelt.

Eine Partialhydrolyse von Fischprotein verschlechtert demgegenüber dessen Fähigkeit zu gelieren, während eine Acylierung der Aminogruppen die Fähigkeiten dieses Proteins, zu gelieren und Emulsionen zu bilden, verbessert^[109]. Eine Acylierung beeinflußt die Eigenschaften von Proteinen in unterschiedlicher Weise: Löslichkeit und Gebrauchseigenschaften von Hefeprotein^[110] werden beeinträchtigt, die Löslichkeit von Sojaprotein^[111] und Casein^[112, 113] wird verbessert. Die Acylierung von Casein mit langkettenigen Acylhalogeniden führt in der Nähe des isoelektrischen Punkts zu einer Gelierung des Proteins^[114].

Eine Phosphorylierung und Sulfatierung von Proteinen trägt dazu bei, die Hydrophilie von Proteinmolekülen zu erhöhen, ihre globuläre Struktur zu stören und die Polypeptidketten aufzufalten. Modifiziert man pflanzliche Proteine auf diese Art, so können sie gelieren. Aus phosphorylierten Proteinen bilden sich weniger steife Gele als aus sulfatierten Proteinen^[115, 116].

Änderungen der physiko-mechanischen Eigenschaften des Mediums und chemische Modifizierungen des Proteinmoleküls beeinflussen die Eigenschaften der Proteine in unterschiedlicher Weise. Eine gezielte Steuerung der Eigenschaften, die für die Funktion des Proteins wichtig sind, ist nur möglich, wenn man für jedes Protein oder für jede Mischung von Proteinen individuell vorgeht.

6. Schlußbetrachtung

In diesem Aufsatz konnten nicht alle Gesichtspunkte und Methoden für die Herstellung von Proteingelen berücksichtigt werden. Das hier zusammengestellte Material ermöglicht es aber, unsere derzeitigen Anschauungen über die Gelierung von Proteinen zu systematisieren und einige Schlußfolgerungen zu ziehen, die von praktischem Nutzen sind.

Der Gelzustand eines Systems ist ein intermediärer, quasistabiler Zustand, der entweder während der Auflösung eines Proteins oder beim entgegengesetzten Prozeß, dem Übergang vom gelösten Zustand ins Präzipitat, auftritt.

Um Proteingele zu erzeugen, gibt es vier fundamentale Prinzipien:

1. Oxidative thermische Strukturierung von Proteinen aufgrund kovalenter Wechselwirkungen zwischen ihren funktionellen Gruppen;
2. Vernetzung von Proteinen durch polyfunktionelle Reagenzien (einschließlich Metall-Ionen) in Lösung;
3. Wahl der physiko-chemischen Bedingungen, unter denen das Protein im System nur begrenzt löslich ist;
4. chemische Modifizierung des Proteinmoleküls zu einem begrenzt löslichen Produkt.

Eingegangen am 13. Februar 1978 [A 283]

Übersetzt von Priv.-Doz. Dr. Volker Rossbach und Dr. F. P. Schmitz, Aachen

- [1] J. H. Ferry, *Adv. Prot. Chem.* 4, 1 (1948).
 [2] Yu. S. Lipatov, I. F. Proshlyakova, *Usp. Khim.* 30, 517 (1961).
 [3] P. Flory, *Faraday Disc. Chem. Soc.* 57, 4 (1974).
 [4] S. P. Papkov, *Kolloidn. Zb.* 19, 333 (1957).
 [5] S. G. Yefimova, S. P. Papkov, *Kolloidn. Zb.* 29, 202 (1967).
 [6] S. P. Papkov, *Vysokomol. Soedin. A* 10, 2691 (1968).
 [7] S. P. Papkov: *The Physico-chemical Fundamentals of the Processing of Polymer Solutions*. Khimiya Publ., Moskau 1971.
 [8] L. Z. Rogovina, G. L. Slonimsky, *Usp. Khim.* 6, 1102 (1974).
 [9] R. Jaenick, *Biophysik* 4, 299 (1973).
 [10] L. I. Slutsky, *Priroda* (Moskau) 2, 78 (1976).
 [11] A. Hiroshi, S. Masako, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 42, 544 (1966).
 [12] S. Muthukrishnan, *Acta Histochem.* 53, 175 (1975).
 [13] A. Patshornik, M. Sokolowsky, *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1860 (1964).
 [14] A. H. Whiting, *Biochem. Biophys. Acta* 243, 332 (1971).
 [15] H. Harding, G. Rogers, *Biochem. Biophys. Acta* 427, 315 (1976).
 [16] A. J. Bailey, T. J. Sims, *Biochem. Biophys. Acta* 153, 211 (1976).
 [17] W. Traub, K. A. Piez, *Adv. Prot. Chem.* 25, 243 (1971).
 [18] R. Aeschbach, R. Amado, H. Neukom, *Biochem. Biophys. Acta* 439 (1976).
 [19] A. N. Mikhailov: *Epidermis Collagen and the Principles of its Processing*. Lyogkaya Industriya Publ., Moskau 1971.
 [20] P. V. Hauschka, J. B. Lian, P. M. Gallop, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 3925 (1975).
 [21] A. Veis: *Macromolecular Chemistry of Gelatin*. Pishchevaya Promyshlennost' Publ., Moskau 1971.
 [22] G. Raikh: *Collagen*. Lyogkaya Industriya Publ., Moskau 1969.
 [23] J. Bello, H. R. Bello, I. R. Vinograd, *Biochem. Biophys. Acta* 57, 214 (1962).
 [24] J. Bello, H. R. Bello, I. R. Vinograd, *Biochem. Biophys. Acta* 57, 222 (1962).
 [25] C. Hafter, H. Hörmann, *Leder* 21, 237 (1970).
 [26] S. S. Nikolayeva, A. N. Mikhailov, *Vysokomol. Soedin. B* 4, 297 (1977).
 [27] E. F. Titova, E. M. Belavtseva, E. E. Braudo, V. B. Tolstogusov, *Colloid Polym. Sci.* 252, 497 (1974).
 [28] V. N. Izmailova, P. A. Rebinder: *Structurization in Protein Systems*. Nauka Publ., Moskau 1974.
 [29] C. Cohen, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 203 (1955).
 [30] W. Kauzman, *Adv. Prot. Chem.* 14, 1 (1959).
 [31] G. Nemethy, H. Scheraga, W. Kauzman, *J. Phys. Chem.* 72, 184 (1968).
 [32] C. Tanford, *J. Am. Chem. Soc.* 84, 4240 (1962).
 [33] C. C. Bigelow, *J. Theor. Biol.* 16, 187 (1967).
 [34] G. P. Yampol'skaya, V. N. Izmailova, V. A. Pchelin, *Vysokomol. Soedin. A* 12, 1923 (1970).
 [35] V. A. Pchelin, V. N. Izmailova, K. T. Ochurova, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 123, 505 (1958).
 [36] V. A. Pchelin, V. N. Izmailova, N. I. Seraya, *Vysokomol. Soedin. I.* 1617 (1959).
 [37] M. P. Tombs, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 57, 158 (1974).
 [38] V. I. Ziyagintsev, A. N. Tolkachov, P. F. Krashenin, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 8, 449 (1972).
 [39] B. Ribadeau-Dumas, G. Brignon, F. Grosclaude, J. C. Mercier, *Eur. J. Biochem.* 25, 505 (1972).
 [40] J. C. Mercier, F. Grosclaude, B. Ribadeau-Dumas, *Eur. J. Biochem.* 23, 41 (1971).
 [41] M. G. Bezrukov, V. M. Belikov, E. M. Belavtseva, E. F. Titova, *Polym. Colloid. Sci.*, im Druck.
 [42] M. Sørensen, S. P. Z. Sørensen, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 23, 55 (1939).
 [43] C. Huggins, D. F. Tapley, E. V. Jensen, *Nature* 167, 592 (1951).
 [44] M. P. Tombs in R. A. Laurie: *Proteins as Human Foods*. Butterworth, London 1970.
 [45] E. Barbu, M. Joly, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 13, 77 (1953).
 [46] M. Steinberg, C. J. Kim, F. I. Schwende, *Science* 190, 992 (1975).
 [47] A. G. Matoltsy, *J. Invest. Dermatol.* 67, 20 (1976).
 [48] H. Aoki, M. Sakurai, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 42, 554 (1968).
 [49] N. I. Wolff, *J. Agr. Food Chem.* 18, 969 (1970).
 [50] K. Saito, M. Kamiya, M. Fujimaki, *Agr. Biol. Chem.* 33, 1301 (1969).
 [51] M. L. Anson, M. Pader, *US-Pat.* 2813024 (1957); *Chem. Abstr.* 52, 5698i (1958).
 [52] S. F. Loepiktie, R. J. Flier, *US-Pat.* 3759715 (1971); *Chem. Abstr.* 75, 145078x (1973).
 [53] G. K. Okumura, J. E. Wilkinson, *US-Pat.* 3490914 (1970); *Chem. Abstr.* 72, 110022c (1970).
 [54] K. Schimasaki, A. Shunrokuro, *J. Biochem. (Tokyo)* 75, 429 (1974).
 [55] J. K. Jones, J. W. Phillips, F. J. R. Hird, *J. Sci. Food Agric.* 25, 1 (1974).
 [56] A. Menger, *Getreide Mehl Brot* 26, 307 (1972).
 [57] R. H. Kilborn, K. H. Tipples, *Cereal Chem.* 50, 70 (1973).
 [58] N. A. Chumachenko, L. A. Markianova, A. P. Demchuk, I. M. Roiter, *Khlebopek. Konditer. Promst.* 5, 17 (1974).
 [59] T. W. Craig, R. G. Henika, *US-Pat.* 3803326 (1974); *R. Zh. Khim.* 7P72II (1975).
 [60] M. Shintaro, I. Katsuharu, *J. Jap. Soc. Food Nutr.* 25, 59 (1972).
 [61] K. Deshmukh, *Connect. Tissue Res.* 2, 95 (1974).
 [62] A. P. De Groot, P. Slump, *J. Nutr.* 96, 45 (1969).
 [63] M. M. Hamdy, *J. Am. Oil Chem. Soc. A* 51, 85 (1974).
 [64] H. D. Waggle, *US-Pat.* 3810764 (1974); *R. Zh. Khim.* 7P61 (1975).
 [65] T. Nagasawa, I. Kijosawa, J. Tokatsu, K. Kawase, *Jap. Kokai* 7340751 (1973); *R. Zh. Khim.* 16P207II (1974).
 [66] M. A. Andrejeva, M. A. Kalinina, N. I. Nazarov, N. N. Shebershneva, *Khlebopek. Konditer. Promst.* 12, 21 (1973).
 [67] M. Shibuya, *Jap. Kokai* 7309452 (1973); *Chem. Abstr.* 80, 49541t (1974).
 [68] K. D. Schwenke, L. Prah, E. Jarmatz, B. Ender, J. Uhlig, A. I. Volnova, S. G. Charatian, *Nahrung* 20, 895 (1976).
 [69] P. Dürre, H. Neukom, *Lebensm. Wiss. Technol.* 7, 89 (1974).
 [70] M. G. Bezrukov, V. M. Belikov, S. V. Rogozhin, N. S. Martinkova, S. V. Vitt, *UdSSR-Urheberschein* 440012 (1972).
 [71] A. Miyata, M. Takahashi, *Jap. Kokai* 7312429 (1973); *Chem. Abstr.* 80, 28511t (1974).
 [72] C. Boragine, R. Kitzing, *DOS* 2133402 (1970); *Chem. Abstr.* 70, 119901d (1972).
 [73] J. Bjorksten, *Adv. Protein Chem.* 6, 343 (1951).
 [74] E. E. Hatfield in: *Effect of Processing Nutritional Value of Feeds*. Proc. Symp. 1972. Natl. Acad. Sci., Washington 1973, S. 171.
 [75] T. N. Barry, N. Z. J. Agric. Res. 15, 107 (1972).
 [76] M. Fidney, H. Higgins, J. Hayes, *Nature* 167, 224 (1951).
 [77] N. Kopaczewsky, *Lait* 16, 81 (1936).
 [78] S. Nakai, H. K. Wilson, E. O. Harrald, *J. Dairy Sci.* 48, 431 (1965).
 [79] M. L. Anson, M. Pader, *US-Pat.* 2813794 (1957); *Chem. Abstr.* 52, 5699e (1958).
 [80] D. Rose, *J. Dairy Sci.* 45, 1305 (1962).
 [81] T. A. Payens, *J. Dairy Sci.* 49, 1317 (1966).
 [82] M. Kalab, *J. Dairy Sci.* 53, 711 (1970).
 [83] M. Kalab, P. W. Voisey, D. B. Emmons, *J. Dairy Sci.* 54, 178 (1971).
 [84] O. Kirschmeier, *Milchwissenschaft* 24, 336 (1969).
 [85] S. Sigaehisa, I. Toru, *Jap. Kokai* 7622068 (1976); *R. Zh. Khim.* 12P56 (1977).
 [86] S. Ohtake, J. Kasuga, T. Nakamoto, *Jap. Kokai* 75117256 (1975); *Chem. Abstr.* 84, 79371 (1976).

- [87] A. S. Zholbosynova, V. N. Izmailova, M. N. Pankratorova, *Kolloidn. Zh.* 32, 49 (1970).
- [88] V. N. Izmailova, M. N. Pankratorova, *Vysokomol. Soedin. B* 14, 182 (1972).
- [89] W. P. Thompson, E. B. Kalan, K. Greenberg, *Milchwissenschaft* 23, 227 (1968).
- [90] P. Dunnill, *Sci. Prog. London* 53, 609 (1965).
- [91] K. Kubo, M. Jano, M. Yokoyama, C. Jamashita, *Jap. Kokai* 7703896 (1975); *Chem. Abstr.* 86, 153968x (1977).
- [92] B. Jurgensons, *Kolloid. J.* 74, 300 (1936).
- [93] N. G. Myers, W. G. France, *J. Phys. Chem.* 44, 1113 (1940).
- [94] J. L. Donnelly, *Kolloid. J.* 74, 343 (1936).
- [95] H. McKenzel, M. Smith, R. Wake, *Biochem.* 69, 229 (1963).
- [96] R. Jaenike, *Z. Naturforsch. B* 20, 21 (1965).
- [97] S. Chiko, *Arch. Biochem. Biophys.* 102, 367 (1963).
- [98] I. N. Bulankin, Ye. V. Parina, R. I. Agronovich, L. O. Liubartseva, L. S. Kolesnik, *Ukr. Biokhim. Zh.* 33, 307 (1961).
- [99] A. S. Zholbosynova, V. N. Izmailova, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 172, 130 (1967).
- [100] V. N. Izmailova, A. S. Zholbosynova, *Kolloidn. Zh.* 29, 677 (1967).
- [101] I. Liang, T. Nakamura, D. Jonezawa, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 48, 49 (1974).
- [102] M. P. Tombs, *Biochem. J.* 96, 119 (1965).
- [103] M. P. Tombs, M. Lowe, *Biochem. J.* 105, 181 (1967).
- [104] O. Kirschmeier, *Milchwissenschaft* 6, 396 (1969).
- [105] I. C. Mercier, I. Uro, B. Ribadeau-Dumas, F. Grosclaude, *Eur. J. Biochem.* 27, 535 (1972).
- [106] K. Hashirumo, T. Watanabe, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 49, 331 (1975).
- [107] A. Pour-El, T. C. Swenson, *Cereal Chem.* 53, 438 (1976).
- [108] A. Pour-El, T. C. Swenson, *US-Pat.* 3932672 (1976); R. Zh. Khim. 18P33911 (1976).
- [109] R. Miller, H. S. Groninger, *J. Food Sci.* 41, 268 (1976).
- [110] M. D. McElwain, T. Richardson, C. H. Amundson, *J. Milk Food Technol.* 38, 521 (1975).
- [111] K. L. Franzen, J. E. Kinsella, *J. Agr. Food Chem.* 24, 788 (1976).
- [112] L. K. Creamer, E. H. Procher, E. N. Lohrey, N. Z. *Dairy Sci. Technol.* 6, 107 (1971).
- [113] M. T. A. Evans, L. Irons, J. H. P. Petty, *Biochem. Biophys. Acta* 243, 259 (1971).
- [114] M. G. Bezrukov, N. S. Martinkova, S. V. Vitt, V. M. Belikov, *UdSSR-Urheberschein* 440013 (1973); *Chem. Abstr.* 83, 204973t (1975).
- [115] R. E. Ferrel, H. S. Olcott, H. Fraenkel-Conrat, *J. Am. Chem. Soc.* 70, 2101 (1948).
- [116] H. S. Olcott, A. Mohammad, *US-Pat.* 2513351 (1950); *Chem. Abstr.* 44, 10217g (1950).

ZUSCHRIFTEN

Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einsendung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vordringliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

endo-Hydroxy-trioxa-tris- σ -homotropilidene^{**}

Von Horst Prinzbach, Christoph Rücker und Hans Fritz[†]

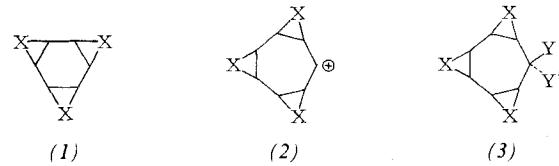
Interessante Aspekte der Chemie der Tris-hetero-tris- σ -homobenzole (1) sind die thermische $[\sigma_2s + \sigma_2s + \sigma_2s]$ -Cycloreversion zu Trisheteroninen^[1a] sowie die regio- und stereoselektive Ringöffnung zu biologisch wichtigen Aminohexiten^[1b].

[*] Prof. Dr. H. Prinzbach [†]. Dipl.-Chem. Ch. Rücker, Prof. Dr. H. Fritz
Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität
Albertstraße 21, D-7800 Freiburg

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Ch. Rücker dankt der Studienstiftung des Deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium.

[†] Korrespondenzautor.

Für ähnliche Ziele – u.a. potentiell „tris-homobenzenoide“ Carbeniumionen des Typs (2) (X=O, NR), Aminoheptite



– werden die spezifisch *endo*-substituierten Tris-hetero-tris- σ -homotropilidene (3) (X=O, NR; Y=OR, Y'=H) benötigt. Für zwei (*cis*-; α,α,β -) der drei isomeren Trioxa-Verbindungen – 1 α , 2 α , 4 α , 5 α , 7 α , 9 α - und 1 α , 2 α , 4 α , 5 β , 7 β , 9 α -3,6,10-Trioxatetracyclo[7.1.0.0^{2,4}.0^{5,7}]decan-8 β -ol (8a) bzw. (11a)^[2] – haben wir mit den Reaktionsfolgen (4b) \rightarrow (5b) \rightarrow (6c) \rightarrow (7c) \rightarrow (8a) bzw. (4b) \rightarrow (5a) \rightarrow (10a) \rightarrow (11a) präparativ brauchbare Synthesen ausgearbeitet^[3].

Ausgangsverbindung ist das aus Tropilidenen gut zugängliche (4b)^[4]; mit der wenig nucleophilen Base Diazabicyclononen (DBN) verläuft die HBr-Eliminierung unter kontrollierten Bedingungen (THF, 20°C, 15h) – anders als z.B. mit Natrium-methanolat/Methanol – konkurrenzlos. Das quantitativ isolierte Diacetat (5b) [Fp=83°C (CCl₄)] dürfte – wie auch das Diol (5a) [Fp=113°C (Aceton)] – laut ¹H-NMR-Analyse [CDCl₃] $J_{1,2}=6.5$, $J_{2,3}=8.5$, $J_{3,4}=4.5$, $J_{4,5}=5$, $J_{5,6}=10.5$, $J_{6,7}<3$, $J_{1,7}=4.5$ Hz] eine Twistkonformation^[5] (Br, 3-OR quasi-äquatorial, 4-OR quasi-axial) bevorzugen, in welcher das Zentrum der C=C-Doppelbindung auf der β -Seite durch 2 β -H wirksam abgeschirmt ist.

Als Vorstufe für (8a) hat (5b) den Vorteil, daß bei der Umsetzung mit HOX der Ort der OH-Addition (C-5, C-6) unerheblich ist, solange diese von der Seite des Epoxidrings (d.h. von der β -Seite) erfolgt; der zweifache Ringschluß führt immer nur zu (8). Da vicinale *trans*-diaxiale H/X-Gruppierungen fehlen, kann die Olefinbildung nicht konkurrieren. Mit HOBr [NBS, Aceton/Wasser (1:1), 50°C, 24 h] bleiben Regio-