

105. Zum Problem der Labwirkung auf Casein¹⁾

von Hs. Nitschmann und W. Lehmann.

(21. III. 47.)

Inhalt.

Es wird nachgewiesen, dass aus Mischlösungen von Säure- und Labcasein durch Calciumionen nicht spezifisch das Labcasein, sondern eine Mischung beider Caseine ausgefällt wird. Das Ergebnis wird diskutiert und gezeigt, dass es eine Stütze für die Labwirkungstheorie von *Linderström-Lang* und *Holter* darstellt.

Über die Reaktion, die sich zwischen dem Enzym Chymase, meist Lab genannt, und dem Casein der Milch abspielt, sind verschiedene Theorien aufgestellt worden, von denen aber keine den Anspruch erheben kann, bewiesen zu sein²⁾. Sicher ist, dass der Eingriff in das komplexe Proteinsystem Casein ein sehr geringfügiger ist, denn er ist mit den gewöhnlichen analytischen Methoden kaum nachweisbar. Eine wirklich sichere Unterscheidung zwischen nativem bzw. mit Säure gefälltem Casein und Labcasein war bisher nur durch die unterschiedliche Löslichkeit der Calciumsalze der beiden Caseine möglich³⁾. Annähernd neutrale Natrium-Labcaseinatlösungen werden durch Calciumionen in einer bestimmten kleinen Minimalkonzentration fast quantitativ ausgeflockt, während Lösungen von Säurecasein unter gleichen Bedingungen nur etwas trüber werden. Das unterschiedliche Verhalten im Calciumionentest bietet aber zunächst wenig Ansatzpunkte für eine Deutung der Labwirkung. Aus dem Umstand, dass auch verschiedene eiweisspaltende Fermente, wie Trypsin und Pepsin, auf Milch koagulierend wirken, wurde frühzeitig geschlossen, dass auch der eigentlichen Labung mit Chymase eine proteolytische Reaktion zugrunde liege. Diese Annahme konnte aber bisher nicht bewiesen werden. *H. Holter*⁴⁾, der diese Frage am sorgfältigsten bearbeitet hat, konnte zwar bei kräftiger Labung von gelöstem Casein eine geringe Zunahme der freien Aminogruppen nachweisen. Aber er stellt selber fest, dass der Effekt nur wenig ausserhalb seiner Fehlergrenze lag und dass es ihm nicht gelang, gleichzeitig einen Zuwachs an Carboxylgruppen festzustellen. Zudem

¹⁾ Der Inhalt dieser Arbeit wurde auszugsweise an der Sommersversammlung 1946 der Schweiz. Chemischen Gesellschaft in Zürich mitgeteilt.

²⁾ Eine zusammenfassende Darstellung findet sich z. B. bei *C. Oppenheimer*: Die Fermente und ihre Wirkungen. Suppl. Bd. II, 863—879 (1939).

³⁾ Neuerdings wurde gefunden, dass sich Lab- und Säurecasein auch durch ihr elektrophoretisches Verhalten eindeutig voneinander unterscheiden lassen (*Hs. Nitschmann* und *W. Lehmann*, Exper. **3**, Heft 4 [1947]).

⁴⁾ *H. Holter*. Bioch. Z. **255**. 160 (1932).

konnte er durch vorsichtige Labung ein durch Calciumionen vollständig fällbares Casein erhalten, lang bevor eine Aminogruppenzunahme nachweisbar war.

Von allen bisher aufgestellten Labwirkungstheorien scheint uns immer noch diejenige von *K. Linderström-Lang*¹⁾ aus dem Jahre 1929 als die wahrscheinlichste. Sie ist später besonders von *H. Holter*²⁾ weiterentwickelt worden. Sie bildete den Ausgangspunkt für unsere Untersuchung und muss deshalb kurz dargelegt werden.

Casein ist nicht einheitlich, sondern aus einigen ähnlichen Proteinen zusammengesetzt, die reversibel assoziieren können. Diese experimentell belegte Erkenntnis geht insbesondere auf *Linderström-Lang* selber zurück; sie ist inzwischen vielfach bestätigt worden, besonders schön durch die elektrophoretischen Untersuchungen von *R. C. Warner*³⁾. Eine der Komponenten soll nun als Schutzkolloid für die Dispersion der Calciumcaseinate wirken und diese in Lösung halten — sofern es sich eben um Milch oder eine Säurecaseinlösung handelt. Lab soll diese Schutzkolloidkomponente spezifisch abbauen oder jedenfalls so verändern, dass sie unwirksam wird; die kolloide Lösung der Calciumcaseinate wird instabil und flockt aus. *Linderström-Lang* erwähnt auch die Möglichkeit, dass der Abbau des Schutzkolloids nicht nur zur Inaktivierung, sondern sogar zur Bildung eines besonders calciumionenempfindlichen und damit fällungsaktiven Spaltstückes führen könnte. Eine Isolierung dieses Schutzkolloids ist bisher niemand gelungen. Immerhin zeigten die von *Linderström-Lang* hergestellten Fraktionen aus Säurecasein grosse Unterschiede in der Calciumionenempfindlichkeit. Seine 20% ausmachende Fraktion K_3 wurde als Natriumcaseinatlösung bei 18° C durch $CaCl_2$ nicht einmal getrübt. Der Rest des Caseins mit der Hauptfraktion K_6 (54%) erwies sich als etwas calciumionenempfindlicher als das Gesamtcasein. Die kleine alkohollösliche Fraktion K_1 (3%) erwies sich sogar als sehr calciumionenempfindlich. *Linderström-Lang*'s Theorie steht — wie er selber vorsichtig feststellt — mit seinen Beobachtungen zum allermindesten nicht im Widerspruch; ein eigentlicher Beweis ist ihm aber so wenig wie später *Holter* gelungen. Uns schien die Theorie jedoch so einleuchtend, dass wir sie einer weiteren Prüfung für wert hielten. Die vorliegende Arbeit stellt einen ersten Beitrag dazu dar.

Wir gingen von folgender Überlegung aus: Mischt man neutrale Lösungen von Natriumsäurecaseinat und Natriumlabcaseinat zu gleichen Teilen und versetzt die Mischung mit zunehmenden Mengen Calciumchlorid, so verhält sie sich — wie erstmals *H. Gerber*⁴⁾ gezeigt

1) *K. Linderström-Lang*, C. r. Trav. Carlsberg **17**, Nr. 9 (1929).

2) L. c.

3) *R. C. Warner*, Am. Soc. **66**, 1725 (1944).

4) *H. Gerber*, Untersuchungen über Säure- und Labcasein. Diss. Bern (1945).

hat — ungefähr so, wie wenn sich die beiden Proteine gegenseitig nicht beeinflussen würden. Bei einem Zusatz von 3 Millimol CaCl_2 pro 100 cm^3 Lösung, der genügen würde, um eine 3-proz. Labcaseinat-lösung quantitativ zu fällen, wird aus einer Mischlösung rund die Hälfte des ganzen Caseins ausgeflockt; der Rest bleibt milchig trübe gelöst.

Die Frage, die wir uns stellten, war nun einfach die: Aus was besteht der Niederschlag? Aus dem zugesetzten Labcasein oder aus einer Mischung von Lab- und Säurecasein? Wenn die Theorie von *Linderström-Lang* richtig ist, so bedeutet dies, dass bei der Labung der grösste Teil des Caseins unverändert bleibt und nur eine Komponente, nämlich das Schutzkolloid, angegriffen wird. Mischt man zum Labcasein Säurecasein, so verteilt sich die Wirkung des Schutzkolloides, das im Säurecasein ja noch aktiv vorhanden ist, in der Lösung auf beide Caseine. Beim Calciumionenzusatz wird sie also von beiden Caseinen einen Teil in Lösung halten; das Ausgefällte muss also ebenfalls aus einer Mischung bestehen. Aus dem Mengenverhältnis von Lab- und Säurecasein im Gefällten sind ausserdem gewisse Schlüsse über den Prozentgehalt an Schutzkolloid möglich.

Wenn — im Gegensatz zu *Linderström-Lang's* Theorie — das Lab alle Caseinteilchen verändert (eine Ansicht, die auch verschiedene Vertreter gefunden hat), so müssen Calciumionen das Labcasein spezifisch ausfällen, während in der Lösung nur Säurecasein zurückbleibt.

Prinzip der Methode.

Um unsere Frage beantworten zu können, mussten wir zuerst imstande sein, Säure- und Labcasein in einer Mischung voneinander zu unterscheiden und ihr Mengenverhältnis quantitativ zu bestimmen. Wir kennen aber keine analytisch erfassbare Grösse, die dies gestatten würde. Es musste also eines der beiden Caseine leicht kenntlich gezeichnet werden, und zwar so, dass seine chemischen und kolloidchemischen Eigenschaften möglichst unverändert blieben. Von den verschiedenen Möglichkeiten wählten wir das Anfärben des Caseins durch Kupplung mit einem Diazoniumsalz¹⁾. Die Lösung eines derart angefärbten Caseins, z. B. eines Säurecaseins, wurde mit der Lösung eines ungefärbten Labcaseins im Verhältnis 1:1 gemischt, dann wurde Calciumchlorid zugegeben und der Niederschlag abzentrifugiert. In der überstehenden Lösung wurde durch eine Stickstoffbestimmung der Gesamtgehalt an Casein und durch eine kolorimetrische Messung der Gehalt an gefärbtem Casein (= Säurecasein) ermittelt. Aus diesen Werten ergibt sich sofort das Verhältnis der beiden Caseine in der Fällung. Die Versuche wurden in gleicher Weise auch mit der umgekehrten Kombination, d. h. mit gefärbtem Labcasein und ungefärbtem Säurecasein, ausgeführt.

Herstellung der Präparate.

a) Säure- und Labcasein.

Das Säurecasein wurde im Prinzip nach der altbekannten Methode von *Hammarsten* unter Verwendung von HCl mit dreimaliger Umfällung dargestellt. Unsere Arbeitsweise ist in der Dissertation von *H. Gerber* genau beschrieben worden. Das Labcasein wurde genau gleich präpariert, mit dem einzigen Unterschied, dass die Milch vor dem Säurezusatz gelabt wurde. Auf 3 Liter Magermilch wurde bei 36°C eine Lösung von 0,4 g Lab-

¹⁾ Nach *Wo. Pauli* und *A. Binz* (*Z. physiol. Ch.* **42**, 517 [1904]) kuppeln Diazoniumsalze mit Proteinen, die Tyrosin oder Histidin enthalten.

pulver¹⁾ zugegeben. Im Laufe von 15 Minuten trat vollständige Koagulation ein. Jetzt wurde HCl bis zum isoelektrischen Punkt des Caseins zugegeben und von da an gleich wie beim Säurecasein weitergearbeitet. Beide Caseine waren praktisch frei von Calcium.

b) Gefärbte Caseine.

Wir kuppelten unsere Caseine zuerst mit den Diazoniumsalzen von Sulfanilsäure und p-Aminobenzoesäure. Es zeigte sich aber, dass dadurch der Charakter der Proteine zu stark verändert wurde (Verschiebung des isoelektrischen Punktes und der Löslichkeitsverhältnisse). Schliesslich fanden wir das p-Benzoesäure-äthylester-diazoniumchlorid als für unsere Zwecke geeignet. Dieses Salz kann leicht rein und kristallisiert hergestellt werden; es ist trocken recht beständig und nicht schlagempfindlich.

10 g Casein wurden mit NaOH in eine ca. 5-proz. neutrale Lösung übergeführt. Es wurden bei Zimmertemperatur 10 cm³ 5-proz. Na₂CO₃-Lösung und das in wenig Wasser gelöste Benzoesäure-äthylester-diazoniumchlorid zugesetzt. Die Kupplung ist nach längstens 1 Minute beendet. Nun wurde das Casein durch HCl-Zusatz bis zum isoelektrischen Punkt (p_H 4,6) ausgeflockt, mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und schliesslich getrocknet.

Wir hatten in Vorversuchen festgestellt, dass 100 Teile von unserem Casein maximal mit 13 Teilen des Diazoniumsalzes zu kuppeln vermögen. Um das Casein möglichst wenig zu verändern, nahmen wir aber bedeutend weniger Diazoniumsalz. Von jedem Casein stellten wir zwei verschieden stark angefarbte Präparate her:

1.	1: 20	angefärbtes Säurecasein	(5% Diazoniumsalz)
2.	1:100	„	„ (1% „)
3.	1: 20	„ Labcasein	(5% „)
4.	1:100	„	„ (1% „)

Die Präparate sind gelb und lösen sich in Alkalien mit orange-roter Farbe. Der Stickstoffgehalt der gefärbten Caseine ist innerhalb der Fehlergrenze gleich wie der der ungefärbten (15,4%).

Kolorimetrie der gefärbten Caseine.

Die kolorimetrischen Messungen wurden mit einem *Pulfrich*-Kolorimeter (*Zeiss*, Jena) ausgeführt. Als geeignetstes Filter wurde das blaue Filter S 47 mit dem Absorptionsmaximum bei 465 Å ermittelt. Da die Azocaseine Indikatorcharakter haben, muss das p_H der zu kolorimetrierenden Lösungen berücksichtigt werden. Wir massen stets in stark alkalischem Milieu (p_H > 12), da dort das p_H keinen Einfluss mehr auf die Absorption hat und wir zudem feststellten, dass der Extinktionskoeffizient über mindestens 24 Stunden unverändert bleibt. Das *Beer'sche* Gesetz wurde über den erforderlichen Konzentrationsbereich (0 bis 0,2%) als erfüllt gefunden. Da später calciumchloridhaltige Lösungen zu kolorimetrieren waren, überzeugten wir uns davon, dass die Messungen an den alkalisch gemachten Lösungen korrekt ausfallen, wenn man nur die feine Trübung von ausgeschiedenem CaCO₃ sorgfältig auszentrifugiert.

Die Fällungsversuche mit Calciumchlorid.

1. Gefärbtes Säurecasein allein.

Bei den Fällungsversuchen gingen wir stets wie folgt vor: Es wurden 25 cm³ 6-proz. Stammlösung hergestellt (allmählicher Zusatz von NaOH, damit p_H nie über 7,5 steigt; End-p_H 6,5—7). Von dieser Lösung wurden viermal je 5 cm³ mit Wasser und steigenden Mengen CaCl₂-Lösung versetzt, so dass stets ein Volumen von 10 cm³ erreicht wurde. Das CaCl₂ wurde nach dem Wasser tropfenweise unter starkem Schütteln der Caseinlösung zugegeben, worauf die Kölbchen 15 Minuten in einen Thermostaten von 35° C gehängt wurden. Dann wurde 15 Minuten bei 2800 Touren/Min. zentrifugiert, die Lösung vorsichtig vom Bodenkörper abgegossen und analysiert (Stickstoff nach *Kjeldahl* und evtl. Extinktionskoeffizient). Die Bedingungen müssen genau eingehalten werden, wenn man reproduzierbare Werte für die total gefällte Caseinmenge bekommen will.

¹⁾ Marke „Rubaco“ der Firma *R. Baumgartner & Co.* in Bern, Stärke 1:100000, Aschegehalt ca. 94%.

Fig. 1 gibt wieder, wieviel vom Säurecasein durch steigende Mengen CaCl_2 ausgefällt wird. Schwach (1:100) angefärbtes Casein verhält sich gleich wie ungefärbtes, während das stärker gefärbte (1:20) bedeutend mehr gefällt wird. Bei den gefärbten Caseinen zeigte sich zudem, dass die aus dem Stickstoffgehalt und die kolorimetrisch ermittelten Werte nicht ganz übereinstimmten. In den stärker gefällten Lösungen war jeweils etwas mehr Casein enthalten, als man nach dem Extinktionskoeffizienten hätte erwarten sollen.

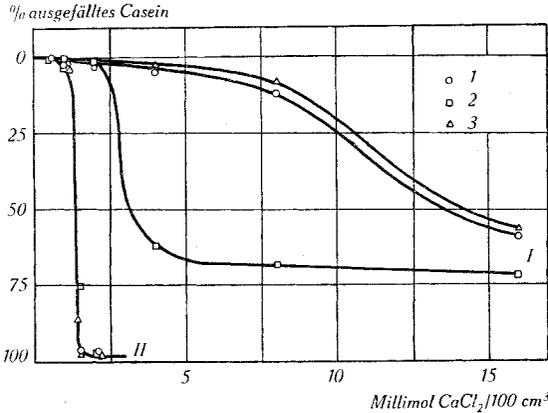


Fig. 1.

Calciumionenfällbarkeit der Caseine (ungemischt).

I: Säurecaseine; II: Labcaseine; 1: ungefärbt; 2: schwach (1:100) gefärbt; 3: stark (1:20) gefärbt.

Dies bedeutet, dass die Caseinteilchen nicht alle gleich stark angefärbt werden und dass die stärker gefärbten bevorzugt gefällt werden. Um später bei den Mischungen aus dem Extinktionskoeffizienten den wirklichen Anteil des gefärbten Caseins ermitteln zu können, mussten deshalb Eichkurven aufgenommen werden. Diese Eichkurven wurden an halb so konzentrierten Lösungen aufgenommen, da in den nachfolgenden Mischungen der gefärbte Anteil auch stets nur $\frac{1}{2}$ betrug. Sie sind in Fig. 2 wiedergegeben. Es zeigte sich, dass die Abweichungen beim schwachgefärbten Casein grösser sind als beim starkgefärbten. Wir kommen auf sie bei der Berechnung der Fehlerbreite unserer Endresultate zurück.

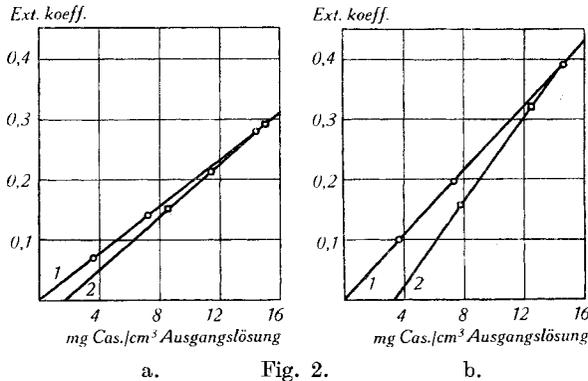


Fig. 2.

Eichkurven für Säurecasein.

1: Verdünnungskurven; 2: Kurven, erhalten durch teilweise Fällung mit CaCl_2 ;
 a: 1:20 angefärbt, Küvettenlänge 1,0 cm, Verdünnung 1:100
 b: 1:100 „ „ 2,0 „ „ 1:25.

2. Gefärbtes Labcasein allein.

Es wurde gleich vorgegangen wie beim Säurecasein, nur dass die zugesetzten CaCl_2 -Mengen bedeutend kleiner gehalten werden mussten. Wie aus Fig. 1 ersichtlich ist, fallen die Fällungskurven der beiden gefärbten Labcaseine mit derjenigen des ungefärbten Präparates zusammen. Die Eichkurven für die spätere Auswertung der Extinktionskoeffizienten des Nichtgefällten sind in Fig. 3 wiedergegeben.

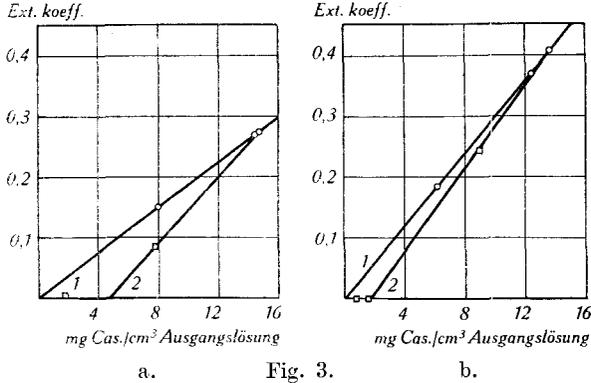


Fig. 3. Eichkurven für Labcasein.

- 1: Verdünnungskurven; 2: Kurven, erhalten durch teilweise Fällung mit CaCl_2 ;
 a: 1:20 angefärbt, Küvettenlänge 1,0 cm, Verdünnung 1:100
 b: 1:100 „ „ „ 2,0 „ „ 1:25.

Wir können zusammenfassend festhalten, dass Säure- und Labcasein auch nach der Anfärbung ihren unterschiedlichen Charakter im Calciumionentest beibehalten.

3. Säure- und Labcasein in Mischung.

Alle untersuchten Mischlösungen enthielten Säure- und Labcasein im Verhältnis 1:1. Die Gesamtproteinkonzentration der Stammlösungen war wiederum 6%.

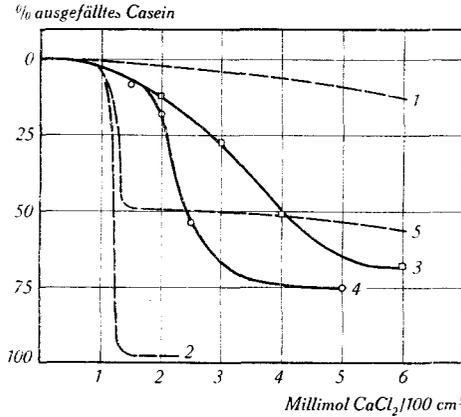


Fig. 4.

Calciumionenfällbarkeit der Caseinmischungen.

- 1: Säurecasein; 2: Labcasein; 3: ungefärbtes Säurecasein+1:100 gefärbtes Labcasein;
 4: 1:100 gefärbtes Säurecasein+ungefärbtes Labcasein; 5: berechnet aus 1 und 2.

a) Ungefärbtes Säure- und gefärbtes Labcasein.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 niedergelegt. Fig. 4 zeigt zudem, dass die Fällungskurve der Mischung mit schwachgefärbtem Labcasein nur sehr ungenau derjenigen folgt, die sich berechnen lässt, wenn man annimmt, dass sich die beiden Caseine in ihrer Fällbarkeit nicht beeinflussen. Mit dem stärkergefärbten Labcasein liegt die Kurve ganz ähnlich.

Tabelle 1.

Ungefärbtes Säurecasein und gefärbtes Labcasein.

	CaCl ₂ Mmcl pro 100 cm ³	Total gefälltes Casein		Nicht gefälltes, gefärbtes Casein mg/cm ³	Gefälltes Lab- casein in % des total gefällten Caseins
		mg/cm ³	%		
Färb. 1:20	2,0	11,7	40,6	8,1 ± 1,3	53,9 ± 11,4
	2,5	17,7	61,5	5,1 ± 1,9	52,5 ± 10,8
	5,0	21,8	75,5	4,1 ± 2,1	47,2 ± 9,7
Färb. 1:100	3,0	6,7	26,8	9,2 ± 0,4	49,2 ± 6,9
	4,0	12,7	50,7	5,6 ± 0,6	54,3 ± 5,0
	6,0	17,0	68,0	3,3 ± 0,7	54,0 ± 4,3

Der Berechnung der Fehlerbreite in der letzten Kolonne wurde besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Wir benützten die bei *Küster-Thiel* (Logarithmische Rechentafeln, S. 188 der Auflage 1940) angegebene Formel. Fehlerbreiten der Stickstoffbestimmungen in den überstehenden Lösungen: ± 1%. Die viel grösseren Fehlerbreiten in den Endresultaten kommen von den kolorimetrisch bestimmten Werten her. Für die Auswertung der Extinktionskoeffizienten gingen wir nämlich so vor, dass wir in Fig. 2a oder b, bzw. Fig. 3a oder b die ganze Differenz zwischen den beiden Kurven (für verdünnte Lösungen und für teilweise ausgefällte Lösungen) als Fehlerbreite für die Konzentrationsbestimmung des nicht gefällten, gefärbten Caseins ansetzten. Als gültigen Wert nahmen wir das arithmetische Mittel zwischen diesen beiden Grenzwerten an, und zwar aus dem Grunde, weil ja bei den Hauptversuchen neben dem gefärbten auch noch gleichviel ungefärbtes Casein vorhanden war im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den Eichmessungen, so dass die Bevorzugung der stärker gefärbten Anteile bei der Calciumionenfällung höchstens gemildert werden konnte. Auf diese Weise haben wir wenigstens ganz sicher die alleräusserst möglichen Fehlergrenzen eingesetzt; persönlich glauben wir, dass die Fehlerbreiten unserer Werte in der letzten Kolonne der Tab. 1 und 2 kleiner sind als dort angegeben.

b) Gefärbtes Säurecasein und ungefärbtes Labcasein.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. 2 niedergelegt. Alle Bedingungen und Berechnungen gleich wie bei a). Die Fällungskurve (total gefälltes Casein in Abhängigkeit der Calciumionenkonzentration) ist zudem für die Kombination mit 1:100 ungefärbtem Säurecasein in Fig. 4 eingezeichnet; sie verläuft ähnlich wie die der umgekehrten Kombination. Diese Werte sind in beiden Fällen schlecht reproduzierbar; dies ist aber für unsere Zwecke belanglos, da uns schliesslich nur das Verhältnis von Säure- zu Labcasein in der Fällung interessiert.

Tabelle 2.
Gefärbtes Säurecasein und ungefärbtes Labcasein.

CaCl ₂ Mmol pro 100 cm ³		Total gefälltes Casein		Nicht gefälltes, gefärbtes Casein mg/cm ³	Gefälltes Lab- casein in % des total gefällten Caseins
		mg/cm ³	%		
Färb. 1:20	2,0	17,3	60,0	6,3 ± 0,5	53,2 ± 3,2
	2,5	22,7	78,9	4,3 ± 0,7	55,5 ± 3,2
	5,0	22,9	79,6	4,0 ± 0,7	54,7 ± 3,2
Färb. 1:100	2,5	15,7	53,7	7,7 ± 0,9	56,0 ± 5,9
	5,0	22,1	75,5	4,9 ± 1,3	56,0 ± 6,0

Diskussion.

Aus Tab. 1 und 2 (letzte Kolonne) geht hervor, dass aus einer Mischlösung von Säure- und Labcasein Calciumionen nicht nur Labcasein, sondern eine Mischung ausfallen und dass das Mengenverhältnis in dieser Fällung nicht sehr viel anders ist, als es in der Lösung war (hier = 1:1). Es ist wichtig, festzustellen, dass dieses Resultat bei beiden Versuchsreihen gefunden wurde, es also nicht darauf ankam, ob in der Mischung das Säure- oder das Labcasein angefärbt war. Dadurch wird das letzte Bedenken zerstört, das Ergebnis könnte durch den Umstand gefälscht sein, dass die Anfärbung der Caseinteilchen ungleich ausfällt und die weniger gefärbten calciumionen-resistenter sind. Die wichtigste Schlussfolgerung aus unseren Versuchen ist somit die, dass bei der Labung nicht das Casein als ganzes grundlegend verändert wird; denn selbst beim empfindlichsten Test, den wir zum Nachweis der eingetretenen Labung haben, demjenigen mit Calciumionen, können diese Ionen Säure- und Labcaseinteilchen nicht voneinander „unterscheiden“, wenn man ihnen gleichzeitig beide gemischt „vorsetzt“. Mit dieser neuen Tatsache muss sich jede Theorie der Labwirkung irgendwie auseinandersetzen.

Die eingangs erwähnte Theorie von *Linderström-Lang* und *Holter*, welche unsere Untersuchung angeregt hat, kann mit den Ergebnissen sehr gut in Einklang gebracht werden. Stark schematisiert, lassen sich unsere Versuche mit ihr ungefähr folgendermassen darstellen (Fig. 5, S. 812).

a) zeigt, wie das reversibel dissoziabile Komponentensystem Casein (K + X) durch die Schutzkolloidkomponente (X) auch bei Gegenwart von Calciumionen in Lösung gehalten wird. Das Schutzkolloid kann, wie wir noch näher begründen werden, mengenmässig nur einen kleineren Teil des gesamten Caseins ausmachen.

b) Lab wirkt auf diese Komponente X in einer noch völlig unbekanntem Weise so, dass sie ihre Fähigkeit verliert, als Schutzkolloid zu wirken. Calciumionen bewirken jetzt Fällung, da das Calciumsalz des Caseins (bzw. der übrigen Caseinfraktionen) an und für sich unlöslich ist. Ob das inaktivierte Schutzkolloid mit ausfällt, ist eine Frage für sich, auf die wir noch zurückkommen; in unserem Schema haben wir es angenommen.

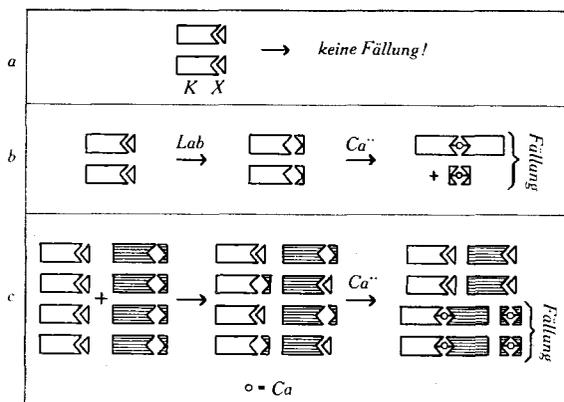


Fig. 5.

c) Nach der Mischung von Säure- mit Labcasein stehen den aktiven Schutzkolloidteilchen doppelt so viele Caseinteilchen gegenüber als zuvor; sie werden also nur einen Teil derselben vor der Fällung mit Calciumionen schützen können. Sie erstrecken aber ihren Schutz wahllos auf Säure- und Labcaseinteilchen, da sie nur eine lockere adsorptive Bindung eingehen und somit leicht hin und her wechseln können. Das Verhältnis von Säure- zu Labcasein im Niederschlag wird — wenn das Schema zutrifft — um so genauer 1:1 sein, je geringer der Mengenanteil des Schutzkolloids im ganzen Caseinkomplex ist. Man kann leicht ausrechnen, dass, wenn das Schutzkolloid X beispielsweise 20% vom gesamten Casein ausmacht, der Niederschlag aus unserer Mischlösung dann aus 60% Labcasein und 40% Säurecasein bestehen müsste. Leider sind die von uns gefundenen Verhältniszahlen aus mitgeteilten Gründen mit einer nicht ganz unbeträchtlichen Ungenauigkeit behaftet. Immerhin möchten wir darauf hinweisen, dass sie durchschnittlich wirklich etwas über 50% liegen (Mittelwert 53%). Wenn die obigen Vorstellungen zuträfen, so ergäbe sich als Konsequenz, dass die Menge der Schutzkolloidkomponente keinesfalls mehr als 20%, wahrscheinlich aber sogar nicht mehr als 10% des Gesamtcaseins betragen kann.

Falls das durch das Lab inaktivierte Schutzkolloid bei der Calciumionenfällung in Lösung bliebe, müsste der Niederschlag genau aus 50% Lab- und 50% Säurecasein bestehen, wie aus der Schemazeichnung wiederum leicht zu ersehen ist.

Zur Frage, ob das Schutzkolloid bei der Labung tatsächlich mitfällt, ist folgendes in Erinnerung zu rufen.

Wenn Calciumcaseinatlösung mit Lab gefällt wird, bleiben ca. 4—5% Protein in Lösung. Dieses sogenannte „Molkeneiweiss“ sollte nach Ansicht von Hammarsten vom Lab aus dem Casein abgespalten worden sein, und man war geneigt, in ihm das inaktivierte Schutzkolloid zu sehen. Cherbuliez¹⁾ konnte aber zeigen, dass dieses Molkeneiweiss identisch mit seiner Fraktion δ sein muss, die er in ungefähr gleicher Menge aus Säurecasein isolieren konnte. Phosphor-, Schwefel-, Methionin- und Tryptophangehalt sowie Löslichkeitsverhältnisse wurden sehr ähnlich gefunden. Der Caseinkomplex ohne die δ -Fraktion konnte in Kalkmilch gelöst werden und koagulierte erst auf Labzusatz, dann aber normal. Hieraus muss geschlossen werden, dass das Molkeneiweiss bzw. das δ -Casein von

¹⁾ E. Cherbuliez, Helv. 22, 959 (1939).

Cherbuliez nicht das Schutzkolloid in *Linderström-Lang-Holter's* Labungsschema sein kann. Dennoch ist es aber so, dass das Lab einen sehr kleinen Teil des Caseins in einer Weise verändert, dass er nachher beim Ansäuern auf den isoelektrischen Punkt (ca. 4,6) nicht mehr ausfällt. Dies geht aus folgendem von uns durchgeführten Versuch hervor¹⁾.

50 cm³ 4-proz. Natriumsäurecaseinatlösung wurde mit 5 cm³ filtrierter Lablösung versetzt (enthielt 0,025 g Lab „Rubaco“ und somit höchstens 0,001 g Protein). Die Mischung wurde 15 Minuten bei 36° C gehalten, dann mit verdünnter Salzsäure gefällt (1,40 cm³ n. HCl)²⁾. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und von der klaren Schotte dreimal 10 cm³ auf den Stickstoffgehalt analysiert. Genau der gleiche Versuch wurde unter Verwendung von durch Hitze inaktivierter Lablösung durchgeführt.

Wir haben diesen Vergleich mehrere Male ausgeführt. Die absoluten Werte des nicht gefällten Stickstoffes sind nicht leicht genau zu reproduzieren; aber wir fanden doch immer, dass in der Schotte mit dem aktiven Lab sich etwas mehr Stickstoff der Fällung entzieht. Nachstehend einige Werte paarweise zusammengestellt (Tab. 3).

Tabelle 3.

Reststickstoff bei der Fällung von Natriumcaseinat- lösung, auf % Casein umgerechnet	
nicht gelabt	gelabt
2,1	2,68
3,0 } 3,45 }	{ — 4,6
2,89 } 2,92 }	{ 3,94 3,94

Die Differenz beträgt durchschnittlich 1% des gesamten Caseins. Ob in diesem einen Prozent löslicher gewordenem Casein tatsächlich die veränderte Schutzkolloidkomponente im Sinne von *Linderström-Lang* und *Holter* oder wenigstens ein Teil derselben vorliegt, wagen wir nicht zu entscheiden, denn es könnte sich hier auch um eine für die eigentliche Labung belanglose Nebenerscheinung — vielleicht verursacht durch Spuren von Pepsin — handeln. Wir begnügen uns also hier einfach, unsere Feststellung mitzuteilen.

Nach der Schutzkolloidtheorie wollen wir nun noch den zweiten Mechanismus diskutieren, der ebenfalls mit unseren Versuchen in

¹⁾ Der Versuch ist in ähnlicher Weise mit ähnlichen Ergebnissen schon von anderen Autoren ausgeführt worden, z. B. *O. Hammarsten*, Z. physiol. Ch. **102**, 33 (1918); *A. E. Sandelin*, Molkereiwiss. Z. **1943**, 1. Da er aber verschiedene Fehlermöglichkeiten birgt, hielten wir es nicht für überflüssig, ihn selbst durchzuführen.

²⁾ Der genaue Fällungspunkt ist an der Klarheit der zentrifugierten Schotte zu erkennen; auch hier überzeugten wir uns, dass weder p_H-Steigerung noch -Senkung zusätzlich trüben.

Einklang stünde: Statt dass ein Schutzkolloid inaktiviert wird, könnte durch das Lab eine fällungsaktive Komponente gebildet werden. Wie unsere Versuche unter dieser Annahme zu deuten wären, möchten wir wiederum in schematischer Darstellung zeigen (Fig. 6).

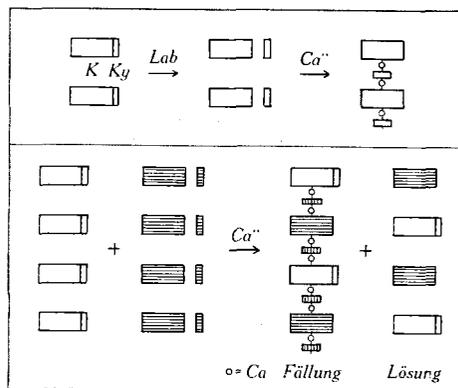


Fig. 6.

Die fällungsaktive Komponente (Ky), die aus irgendeinem Teil des Caseinkomplexes (K) gebildet wird, aggregiert unter Mitwirkung von Calciumionen die übrigen Caseinteilchen und lässt sie schliesslich ausflocken. Es ist ersichtlich, dass auch hier aus einer Mischlösung von Lab- und Säurecasein beide gemeinsam ausfallen werden und dass der Anteil des Labcaseins in der Mischfällung wieder um so mehr über 50% hinausgehen wird, je grösser der Prozentgehalt an fällungsaktiver Komponente im Labcasein ist.

In unserem Schema bleibt es dahingestellt, ob Ky ein Spaltstück aus einer der Caseinfraktionen ist, oder ob Ky schon als selbständige Komponente im nativen Casein enthalten ist und durch das Lab nur irgendeine Veränderung erleidet, die diese Fällungsaktivität zur Folge hat. Eine solche Veränderung könnte in der Freilegung oder Bildung irgendeiner calciumionbindenden Gruppe bestehen. Wenn nur wenige Aminosäurereste betroffen werden, könnte sich eine solche Reaktion dem Nachweis mit den gewöhnlichen Analysemethoden leicht entziehen. Es ist in diesem Zusammenhang nicht ohne Interesse, sich zu vergegenwärtigen, wieviel Calciumion für die vollständige Fällung des Labcaseins nötig ist. Aus den der Fig. 1 zu entnehmenden Daten lässt sich leicht errechnen, dass unser Labcasein ausfällt, wenn auf ca. 200 Aminosäurereste 1 Calciumion zugegeben wird, was wirklich erstaunlich wenig ist.

Es ist bisher von fast allen Autoren angenommen worden, dass der entscheidende Vorgang bei der Labung eine Hauptvalenzreaktion, z. B. eine Hydrolyse, sei. Diese Annahme ist, wie gesagt, unbewiesen; es spricht für sie allerdings die Tatsache, dass viele proteolytische Fermente (besonders Pepsin und Trypsin) ebenfalls labenden Charakter haben, wobei sich allerdings die Erscheinungen unspezifischen Abbaues überlagern. Immerhin scheint es uns nicht ganz ausgeschlossen, dass es sich auch einfach um eine Denaturierung handeln könnte. Denaturierung deuten wir heute ja als Entfaltung oder Umfaltung der Peptidketten, und wir wissen auch, dass dabei funktionelle Gruppen blossgelegt werden können (z. B. —SH), die

sich vorher dem analytischen Nachweis entzogen haben. Der Gedanke, dass das Lab als spezifische „Denaturase“ für eine bestimmte Komponente des Caseins wirkt, wäre vielleicht einer näheren Prüfung wert.

Im Hinblick auf die unverkennbaren Analogien zwischen der Milchgerinnung mit Lab und der Blutgerinnung sei noch daran erinnert, dass von manchen Autoren¹⁾ auch der Übergang des Fibrinogens in Fibrin als Denaturierung und dementsprechend das Thrombin als Denaturase betrachtet wird. Die chemische Denaturierung ist ein mehr oder weniger unspezifischer Vorgang und kann durch verschiedene Stoffe ausgelöst werden. Tatsächlich kann ja die Fibrinbildung in Fibrinogenlösungen auch durch andere Stoffe als nur das Thrombin bewerkstelligt werden, z. B. durch Papain²⁾.

Noch unspezifischer verläuft die Milchgerinnung; denn sie wird bekanntlich nicht nur durch proteolytische Fermente, sondern auch durch die Säfte der verschiedensten Pflanzen eingeleitet. Näheres ist aber über die sich dabei abspielenden Vorgänge ebensowenig bekannt wie über die Wirkung des Labes selber.

Abschliessend halten wir fest:

Aus dem Ergebnis unserer Mischfällungen geht hervor, dass bei der Labung nicht alle Caseinfraktionen verändert werden, so dass man sagen könnte, das Casein ist als Ganzes umgewandelt worden. Ob das Lab ein Schutzkolloid inaktiviert oder im Gegenteil eine erst mit Calciumionen fällungsaktive Komponente bildet oder ob es vielleicht sogar das erste in das zweite überführt, kann wohl erst entschieden werden, wenn es gelingt, diese Caseinfraktionen zu isolieren.

Der Chemismus der eigentlichen Fermentreaktion (Hauptvalenzreaktion oder Denaturierung) bleibt nach wie vor ungeklärt und man ist mehr oder weniger auf Vermutungen angewiesen. Aus unserer Untersuchung ergaben sich aber ziemlich bestimmte Fragen, deren experimentelle Bearbeitung die Labforschung, welche in der letzten Zeit merkwürdig stagnierte, vielleicht etwas weiter bringen könnte.

Universität Bern, Institut für allgemeine
und spezielle organische Chemie.

¹⁾ Vgl. besonders *E. Wöhlisch*, Koll. Z. **85**, 179 (1939).

²⁾ *H. Eagle* und *T. N. Harris*, J. Gen. Physiol. **1937**, 543; *E. Wöhlisch* und *L. Jühling*, Bioch. Z. **297**, 353 (1938).