

SUMMARY.

Attempts to remove water from 3,4-di-p-anisyl-1-hexyn-3-ol in acid medium resulted in rearrangement according to *Meyer-Schuster* principally and to *Rupe* to a minor extent. None of the derivatives of these rearrangement products reached the oestrogenicity of stilboestrol. The dehydration of 3,4-di-p-anisyl-3-hexen-2-ol does not lead to the expected diene but to the corresponding methylether of the known 1-ethyl-2-p-hydroxyphenyl-3-methyl-5-hydroxyindene.

Pharmazeutische Abteilung
der *Ed. Geistlich Söhne AG.*, Wolhusen.

**241. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch¹).
VII. Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (NPN)
aus Casein durch Lab und ihre Beziehung zur Primärreaktion
der Labgerinnung der Milch²)**

von **Ch. Alais³), G. Mocquot³), Hs. Nitschmann** und **P. Zahler**.

(13. X. 53.)

Einleitung.

Es ist seit langem bekannt, dass die Labgerinnung der Milch aus mindestens zwei verschiedenen Vorgängen besteht, nämlich der Primärreaktion, bei der das Enzym das Casein chemisch verändert, und der Sekundärreaktion, die wohl nichts anderes ist als die Koagulation des enzymatisch angegriffenen Caseins als Calciumsalz. Für Reaktionsgeschwindigkeitsmessungen der Labgerinnung wird stets die Sekundärreaktion benutzt, indem man z. B. die Zeit misst, die vom Labzusatz bis zum Auftreten von mit blossem Auge sichtbaren Flocken verstreicht. Eine Möglichkeit, die besonders interessante Primärreaktion direkt messend zu verfolgen, gab es bisher nicht, denn man konnte keine während der Labung auftretende Veränderungen des Caseins, die sich mit der erforderlichen Genauigkeit quantitativ hätten erfassen lassen.

Es liegt zwar nahe, die Fällbarkeit durch Calcium-Ionen, die das gelabte Casein (Paracasein) vor nativem Casein voraus hat, heran-

¹) Nr. VI dieser Reihe: *H. Mattenheimer, Hs. Nitschmann & P. Zahler*, *Helv. 35*, 1970 (1952).

²) Mitgeteilt an der Winterversammlung der Schweiz. Chemischen Gesellschaft in Neuenburg, 1. März 1953. Siehe Autorreferat in: *Chim. 7*, 93 (1953).

³) Adresse: Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières (Institut National de la Recherche Agronomique), Jouy-en-Josas (Seine et Oise), France.

zuziehen. Der eine von uns (*N.*) hat jedoch mit *R. Varin*¹⁾ gezeigt, dass man auf diesem Wege nicht zum Ziele kommt.

Zur gewünschten Zeit müsste das Lab inaktiviert²⁾ und das mit Calcium fällbare Casein quantitativ bestimmt werden. Eine Mischung von Casein und Labcasein wird wohl durch Calcium nur partiell gefällt, aber die Ergebnisse sind unübersichtlich und schwer reproduzierbar. Der Grund hierfür liegt darin, dass eine Trennung von gelabtem und ungelabtem Casein durch Calcium, wie *Nitschmann & Lehmann*³⁾ eindeutig festgestellt haben, gar nicht erreicht wird. Der Fällung der Mischung geht eben die Bildung kolloider Aggregate, wie sie auch in der Milch vorliegen, voraus. Sie sind aus nativem und gelabtem Casein zusammengesetzt, und für die nachfolgende, allerdings partielle Koagulation gilt deshalb die Phasenregel nicht.

*Nitschmann & Varin*⁴⁾ haben den bei Verwendung grosser Lab-Dosen eintretenden proteolytischen Abbau des Caseins titrimetrisch verfolgen können. Ihre Messungen haben aber in Bestätigung älterer Versuche⁵⁾ ergeben, dass die Proteolyse zur Zeit der Gerinnung einer Milch noch viel zu gering ist, um so mit Sicherheit erfasst werden zu können. Zudem wissen wir ja noch nicht, ob die Primärreaktion überhaupt eine Proteolyse ist. Von dieser Seite kommt man also auch nicht an die gesuchte Reaktion heran.

Bei der Labgerinnung der Milch bleibt bekanntlich ein kleiner Teil des Caseins in Lösung (Molkenalbumose). Ein ungefähr gleicher Anteil bleibt auch gelöst, wenn man Natriumcaseinatlösung labt und dann durch Säurezusatz bei pH 4,6 isoelektrisch fällt. Diese Tatsache hat, wie uns scheint, nicht die ihr gebührende Beachtung gefunden. Wir haben nun die während der Labung erfolgende Abspaltung leichter löslicher Fragmente zeitlich quantitativ verfolgt. Dazu haben wir den durch Trichloressigsäure nicht mehr fällbaren Stickstoff⁶⁾ bestimmt. Die sehr charakteristische Form der so erhaltenen Kurven lässt vermuten, dass sie den Verlauf der Primärreaktion der Labung wiedergeben.

Methodisches.

Als Substrat wurde frische entrahmte Mischmilch oder Natriumcaseinatlösung vom pH 6,8 verwendet. Zur Herstellung der letzteren diente ein aus Mischmilch frisch hergestelltes, unter Vermeidung extremer pH 3mal umgefälltes und mit Alkohol und Äther extrahiertes Säurecasein. Als Lab verwendeten wir teils ein technisches Präparat der Firma *Hansen*, Kopenhagen, meist aber das durch *N. J. Berridge*⁷⁾ kristallisierte Präparat⁸⁾. Beide Labpräparate sind früher genauer charakterisiert worden⁹⁾.

1) *R. Varin*, Beiträge zur Kenntnis der Labwirkung. Diss., Bern 1951.

2) Gelingt beispielsweise durch vorübergehende pH-Erhöhung auf 8 bis 9.

3) *Hs. Nitschmann & W. Lehmann*, *Helv.* **30**, 804 (1947).

4) *Hs. Nitschmann & R. Varin*, *Helv.* **34**, 1421 (1951).

5) Siehe besonders: *H. Holter*, *Bioch. Z.* **255**, 160 (1932).

6) Wir bezeichnen ihn im folgenden als Nicht-Protein-Stickstoff (NPN), ohne damit etwas über die Molekülgrösse aussagen zu wollen.

7) *N. J. Berridge*, *Biochem. J.* **39**, 179 (1945).

8) Der Firma *Hansen* und Dr. *Berridge* sind wir für die geschenkweise Überlassung der Präparate zu Dank verpflichtet.

9) *H. Schwander*, *P. Zahler & Hs. Nitschmann*, *Helv.* **35**, 553 (1952); *H. Mattenheimer*, *Hs. Nitschmann & P. Zahler*, *Helv.* **35**, 1970 (1952).

Substrat und Enzym werden im Thermostaten (meist bei 25°) nach Vorwärmung zusammengegeben¹⁾ und gut gemischt. In geeigneten Zeitabständen werden dann stets gleiche Teile des Gemisches abpipettiert und sofort mit Trichloressigsäure gefällt. Dabei gingen wir meist nach der Vorschrift von Rowland²⁾ zur Bestimmung des Nichtproteinstickstoffes der Milch vor. Danach wird ein Teil Milch, bzw. Na-Caseinatlösung mit 4 Teilen 15-proz. Trichloressigsäure (TCE) vermischt: Endkonzentration an TCE 12%. Bei einigen Versuchen wurde die TCE-Konzentration variiert. Es wird sehr gut durchgeschüttelt und nach 10 Min. durch ein Faltenfilter filtriert. Das Filtrat soll vollkommen klar sein. Wenn mit Milch gearbeitet wird, muss der Ansatz von Anfang an in abgemessene Portionen aufgeteilt werden, die man als Ganzes fällt, weil die eintretende Koagulation ein Abpipettieren verhindert. Zur Bestimmung des Nullwertes wird das Substrat zuerst mit TCE gefällt und dann erst das Lab zugegeben. In aliquoten Teilen der Filtrate wird der Stickstoff (z. B. nach Kjeldahl) bestimmt. Kontrollversuche können mit Substrat und Hitze-inaktiviertem Lab (10 Min. bei 80°) durchgeführt werden.

Versuche mit Milch und nativem Calciumphosphocaseinat aus Milch.

In Fig. 1 ist eine Auswahl von Kurven wiedergegeben, die an verschiedenen Milchproben teils mit *Hansen-Lab* und teils mit kristallisiertem Lab erhalten wurden. Temp. 25°. Die Pfeile zeigen den Moment der Gerinnung (erste, beim Schütteln sichtbare Flocken) in einem parallel mit der gleichen Mischung unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuch an.

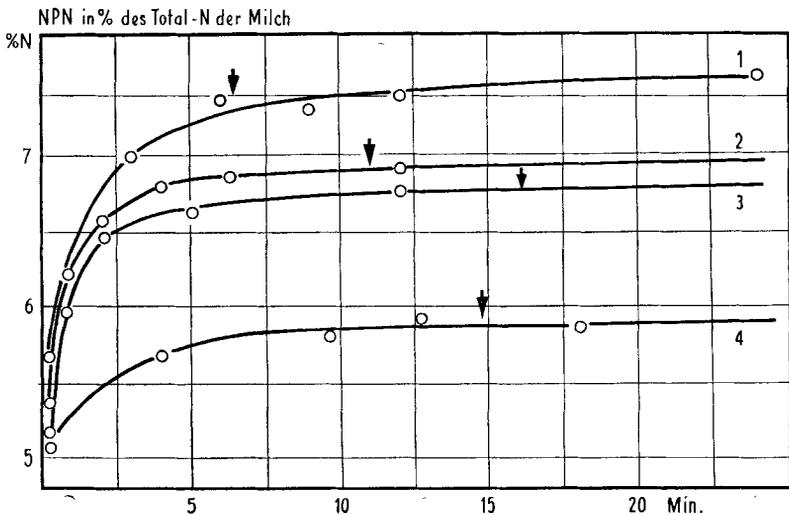


Fig. 1.

Zeitlicher Verlauf der NPN-Abspaltung bei Milch. 12% TCE.

Kurven 1 und 4: mit *Hansen-Lab*.,

Kurven 2 und 3: mit kristallisiertem Lab.

Alle Kurven (auch weitere hier nicht abgebildete) haben gemeinsam, dass sie zu Beginn am stärksten ansteigen, sich dann abflachen, um schliesslich fast parallel der Zeitachse zu verlaufen. Die

¹⁾ Bei länger dauernden Versuchen Zusatz von etwas Thymol als Bakteriostatikum.

²⁾ S. J. Rowland, J. Dairy Res. 9, 42 (1938).

Gerinnung tritt – bei 25° wenigstens – erst ein, wenn die NPN-Abspaltung praktisch beendet ist. Technisches und kristallisiertes Lab wirken gleich. Die Zunahme des NPN variiert ziemlich stark (zwischen 1,3 und 2,5% bezogen auf den Casein-Stickstoff des Substrates). Milch ist eben ein in seinem Verhalten gegenüber Lab recht unkonstantes Substrat. Die Gründe für diese Tatsache bleiben allerdings noch abzuklären. In dem ausserordentlich flachen Anstieg des zweiten Kurventeiles kommt der allgemeine proteolytische Abbau¹⁾ des Substrates durch das Ferment zum Ausdruck.

Durch Superzentrifugierung von Magermilch erhaltenes Calciumphosphocaseinat, das mit destilliertem Wasser gewaschen und schliesslich in solchem wieder dispergiert worden war, verhält sich analog wie Magermilch. Das Protein, von dem der NPN abgespalten wird, ist also sicher ein Baustein der kugeligen, im Elektronenmikroskop sichtbaren Calciumphosphocaseinat-Aggregate, die der Magermilch ihre weisse Farbe geben.

Es stellt sich die Frage, ob die Abflachung der Kurven nicht einfach auf eine Inaktivierung des Fermentes zurückzuführen ist. Zu ihrer Beantwortung wäre der Mischung, nachdem der NPN konstant geworden ist, eine neue Portion Lab zuzusetzen. Wegen der bei 25° durch die Labung ausgelösten Gelierung haben wir diesen Versuch bei 0° gemacht, wo die Primärreaktion noch abläuft, aber keine massive Koagulation der Milch eintritt. Da dieser zweite Labzusatz keinen erneuten Anstieg der NPN-Zeit-Kurve zur Folge hatte (er lässt nur den flachen Teil der Kurve ein klein wenig steiler werden), kann Inaktivierung nicht für die Abflachung der Kurven verantwortlich gemacht werden²⁾.

Versuche mit Natriumcaseinatlösungen.

Die Kurven der Fig. 2 wurden alle mit der gleichen Na-Caseinatlösung von 0,7% N-Gehalt (entspricht ca. 4,7% Casein) erhalten. Kristallisiertes Lab in wechselnden Mengen. TCE-Endkonzentration 12% oder 2%. Temp. 25°. NPN-Ausgangswert für die Zeit 0 für alle Kurven gleich (0,15%).

Die Kurven Nr. 1–3 lassen erkennen, dass die NPN-Abspaltung bei Fällung mit 12% TCE ganz ähnlich verläuft wie bei Milch. Bemerkenswert ist, dass die NPN-Endwerte von der Menge des zugesetzten Labes unabhängig sind. Dies bestätigt wieder, dass Inaktivierung des Fermentes nicht im Spiele ist. Die Unterschiede in der Abspaltungsgeschwindigkeit kommen in der verschiedenen Steilheit der ersten Kurvenstücke zum Ausdruck. Die Zunahme des NPN beträgt ca. 1,6% des gesamten Stickstoffes. Mit andern Caseinpräparaten kann man von diesem etwas abweichende Werte finden, doch ist die Kurvenform stets die gleiche.

¹⁾ Vgl. *Hs. Nitschmann & R. Varin*, *Helv.* **34**, 1421 (1951).

²⁾ Ein analoger Kontrollversuch bei 25° an Na-Caseinatlösung hat dasselbe ergeben.

Bei den Kurven 4–6 (Fällung mit nur 2% TCE) fällt besonders auf, dass das „flache“ Kurvenstück viel weniger flach ist und dass seine Neigung stark von der Enzymkonzentration abhängt. Da die

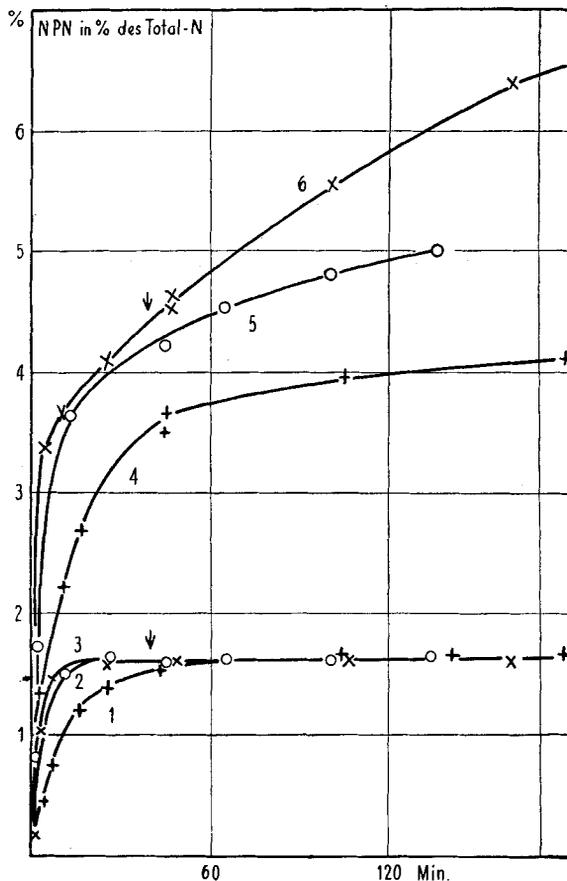


Fig. 2.

NPN-Abspaltung bei Na-Caseinat mit krist. Lab.

Kurve Nr.	Einheiten ¹⁾ Lab pro cm ³	% TCE	Kurve Nr.	Einheiten ¹⁾ Lab pro cm ³	% TCE
1	0,025	12	4	0,025	2
2	0,10		5	0,10	
3	0,25 ²⁾		6	0,25 ²⁾	

Steilheit der Kurven nach der Wendung den Verlauf der allgemeinen Proteolyse zum Ausdruck bringt, lässt sich aus Figur 2 folgendes ablesen: Diese allgemeine Proteolyse kann nicht so vor sich gehen, wie

¹⁾ Einheiten nach *Berridge* (*Biochem. J.* **39**, 179 (1945)) an Milch bei 35° bestimmt.

²⁾ Diese Konzentration würde Milch bei 25° in ca. 16 Min. zur Gerinnung bringen (Pfeil in Fig. 2).

z. B. beim Pepsinabbau des Ovalbumins¹⁾, wo der erste Angriff schwierig erfolgt, wo aber die einmal angeknackten Molekeln – weil wahrscheinlich eine Denaturierung dazukommt – sehr rasch bis zu kleinen Peptiden abgebaut werden. Dann findet man nämlich während des Abbaues neben intakten Molekeln praktisch nur sehr kleine Bruchstücke. Hier ist es aber gerade so, dass zu einem Zeitpunkt, wo die Zahl der gespaltenen Peptidgruppen noch unter der titrimetrisch erfassbaren Grenze liegt, schon beträchtliche Mengen von Material gebildet werden, das in 2-proz. TCE löslich ist, nicht aber in 12-proz. Dieses Material muss aus relativ grossen Bruchstücken bestehen, die durch Spaltung nur ganz weniger Peptidbindungen entstanden sind. Der allgemeine proteolytische Abbau des Caseins durch das Lab scheint also dem gleichen Typ anzugehören, wie er z. B. für den Abbau des β -Lactoglobulins durch das Trypsin nachgewiesen wurde¹⁾.

Der einigermaßen geradlinige Verlauf der Kurven 4, 5 und 6 (Fig. 2) nach der Wendung gestattet, sie rückwärts bis zur Zeit 0 zu verlängern. Die so erhaltenen Abschnitte auf der NPN-Achse betragen im Mittel 3,8, sind also viel grösser als bei den Kurven mit 12% TCE. Das könnte zweierlei bedeuten, nämlich entweder, dass nur ein einheitliches Spaltprodukt entsteht, welches in 2-proz. TCE ca. doppelt so löslich ist als in 12-proz., oder, dass zwei oder mehrere Spaltstücke verschiedener Löslichkeit entstehen und dass 12-proz. TCE eine fraktionierte Fällung bewirkt. Wenn ersteres richtig wäre (nur ein Spaltprodukt), dann müsste die praktisch vollkommene Abflachung der Kurven 1–3 (12% TCE) in Figur 2 einfach darauf zurückzuführen sein, dass hier die Sättigung für das Spaltprodukt erreicht ist. Jeder Zuwachs würde dann nur noch den Bodenkörper vermehren, und die Kurven gäben nur am Anfang den wirklichen Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit wieder. Der in diesem Falle allerdings zu erwartende Knick in den Kurven könnte uns eventuell entgangen sein. Die Frage wird aber durch folgenden Versuch eindeutig entschieden:

Von einem Labungsversuch, der unter genau gleichen Bedingungen wie Nr. 3 aus Fig. 2 durchgeführt worden war, wurden nach 40 Min., also nach Abschluss der „Primärreaktion“, drei gleiche Teile mit TCE so gefällt, dass die Mischungen sich bei gleicher TCE-Konzentration nur durch ihre Volumina unterschieden. Die Filtrate wurden auf ihren N-Gehalt analysiert. Dieser Versuch wurde für eine TCE-Endkonzentration von sowohl 12% als auch 2% durchgeführt (siehe Tab. 1).

Wenn das TCE-Filtrat der ausgelabten Caseinlösung bei Versuch Nr. 1 (Standardbedingungen) gesättigt an Spaltprodukt gewesen wäre, hätten die N-Konzentrationen in den Filtraten 2 und 3 nicht höher als in 1 sein sollen. Sie sind aber bei den 2%-TCE-Versuchen genau und bei den 12%-TCE-Versuchen fast proportional der Ge-

¹⁾ K. U. Linderström-Lang, XII. Int. Congress of Pure and Applied Chemistry, New York, 1951; resumiert in Chem. Engin. News **29**, 3942 (1951).

samtvolumenverminderung gestiegen. Die Abbiegung der NPN-Abspaltungskurven der Figur 2 ist demnach nicht auf Sättigung der TCE mit Spaltprodukt zurückzuführen, sondern sie zeigt das Ende einer Reaktion an. Um genau zu sein, muss man allerdings feststellen, dass die 12-proz. TCE natürlich gesättigt an den schwerer löslichen Spaltprodukten, die durch 2-proz. TCE nicht mehr gefällt werden, sein muss. Das ist auch der Grund dafür, warum bei den 12-proz. TCE-Filtraten die NPN-Ausbeute bei der Volumenverminderung etwas zurückgeblieben ist (siehe letzte Spalte der Tab. 1)¹⁾.

Tabelle 1.

Ver- suchs- Nr.	Vol. gelabte Caseinat- lösung	Vol. nach Zusatz der TCE	Endkonz. der TCE	N-Konz. im Filtrat mg/cm ³	NPN- Ausbeute ²⁾
1 ³⁾	1	5	12	0,16	100
2	1	3	12	0,215	81
3	1	2	12	0,315	79
4 ³⁾	1	5	2	0,320	100
5	1	3	2	0,535	99
6	1	2	2	0,810	99

Aus diesen Versuchen kann also bereits der Schluss gezogen werden, dass mindestens der in 2-proz. TCE in Lösung bleibende NPN nicht einheitlich sein kann. Über die Einheitlichkeit des in 12-proz. TCE löslichen NPN sagen sie nichts aus. Eine Untersuchung dieser Caseinspaltprodukte des Labes ist begonnen. Wir können jetzt schon mitteilen, dass die Hauptmenge des in 12-proz. TCE löslichen Produktes sich bei der Chromatographie und der Elektrophorese auf Papier einigermaßen einheitlich zu verhalten scheint, während das in 2-proz. TCE lösliche Produkt sehr deutlich mehrere Fraktionen erkennen lässt.

Im Anschluss an diese Ergebnisse haben wir den Einfluss der TCE-Konzentration auf die Menge des NPN näher untersucht (siehe Fig. 3).

Versuchsbedingungen: Na-Caseinat-Lösung mit 0,7% N+0,25 Einheiten krist. Lab pro cm³, d. h. gleich wie für die Kurven 3 und 6 in Fig. 2. Temp. 25°.

Mehrere gleichartige Ansätze wurden alle zur selben Zeit (nach 40 Min. Inkubation), aber mit verschiedenen Konzentrationen an TCE gefällt (Endvolumen gleich!). Nach dieser Zeit ist bei den gewählten Bedingungen die Primärreaktion sicher abgeschlossen (vgl. Fig. 2).

¹⁾ Aus dem gleichen Grunde werden höhere NPN-Ausbeuten gefunden, wenn man für die Labungsversuche von Anfang an wesentlich verdünntere Caseinlösungen nimmt, als wir es hier getan haben.

²⁾ Für Versuch 1 und 4 willkürlich gleich 100 gesetzt.

³⁾ Die Fällungsbedingungen der Versuche 1 und 4 sind unsere üblichen und entsprechen denen der Versuche in Fig. 2.

Während die NPN-Werte von ungelabtem Casein von der TCE-Konzentration bis hinunter zu 1% unabhängig sind, gilt dies bei gelabtem Casein nur für TCE-Konzentrationen zwischen 26 und 18%; darunter steigen die NPN-Werte mit abnehmender TCE-Konzentration immer stärker an.

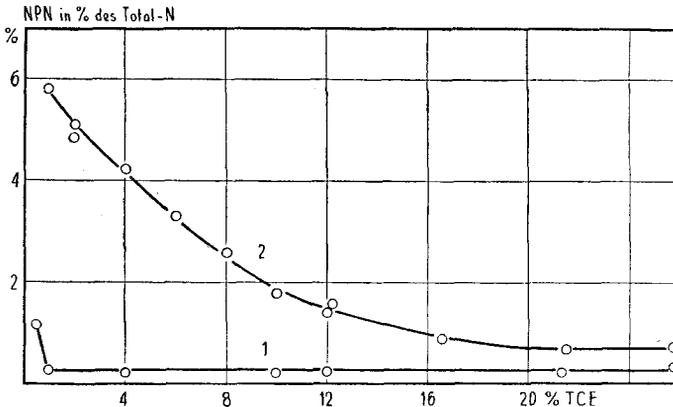


Fig. 3.

Einfluss der TCE-Konzentration auf die NPN-Werte.

Kurve 1: Vor der Labung.

Kurve 2: Nach der Labung.

Da die Kurve 2 nach dem zuvor Gesagten die Kurve der fraktionierten Fällung eines Stoffgemisches sein muss, ist zu erwarten, dass sie bei sehr genauer Aufnahme mehr oder weniger deutliche Stufen zeigen würde.

Figur 3 zeigt, dass es beim gelabten Casein – und für Milch dürfte dasselbe gelten – ziemlich willkürlich ist, was man als Nichtproteinstickstoff bezeichnen will. Da Trichloressigsäure heute sehr viel und in verschiedenen Konzentrationen als Fällungsmittel bei der Bestimmung des NPN gebraucht wird, ist diese Feststellung nicht ohne Bedeutung.

Die NPN-Werte, die man mit 2% TCE findet, stimmen ziemlich gut mit den in der Literatur für die Molkenalbumose angegebenen Zahlen überein. Wir haben deshalb die zeitliche Abspaltungskurve der Molkenalbumose mit unseren NPN-Zeit-Kurven verglichen (Fig. 4).

Ansatz: 2-proz. Casein (als Na-Caseinat von pH 6,9) + krist. Lab in einer Konzentration, die frische Mischmagermilch bei der Versuchstemperatur (25°) in ca. 7 Min. zur Gerinnung bringen würde.

Fällungsbedingungen: für Kurve 1: 5 Teile Caseinlösung + 1 Teil HCl (genau äquivalent der zur Auflösung des Caseins benötigten NaOH, so dass isoelektrische Fällung erreicht wird); gibt Filtrat 1;

für Kurve 2: 5 Teile Caseinlösung + 10 Teile 7,5-proz. TCE (Endkonzentration also 5%); gibt Filtrat 2;

für Kurve 3: 2 Teile Filtrat 1 + 4 Teile 7,5-proz. TCE (Endkonzentration auch hier 5%); gibt erneute Fällung und Filtrat 3.

Der Pfeil in Fig. 4 zeigt die unter gleichen Bedingungen an Milch gemessene Gerinnungszeit an.

Kurve 2 (Fällung mit 5% TCE) zeigt den erwarteten Verlauf. Die NPN-Zunahme beträgt hier 2,1% des Gesamt-N.

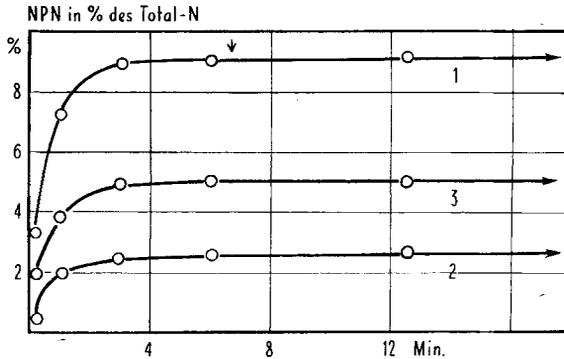


Fig. 4.

Zeitlicher Verlauf der Abspaltung der Molkenalbumose (Kurve 1),
verglichen mit der des NPN (Kurven 2 und 3).

Kurve 1 (isoelektrische Fällung) verläuft ganz analog mit einem ebenso flachen Plateau; der 12-Min.-Wert ist auch nach 30 Min. noch unverändert. Die Zunahme an NPN bzw. Molkenalbumose beträgt in diesem Falle aber 5,7%. Dass das Plateau hier so flach ist, während es bei Fällung mit 2% TCE steigt, kann nichts anderes bedeuten, als dass die ersten Produkte des allgemeinen, unspezifischen proteolytischen Abbaues beim stark sauren pH der 2-proz. TCE leichter löslich sind als bei pH 4,6–4,8 (isoelektrischer Punkt des Caseins).

Bei Kurve 3 (Nachfällung des isoelektrischen Filtrates 1 mit 5% TCE) beträgt die NPN-Zunahme 3,1%. Sie ist also wider Erwarten wesentlich höher als bei direkter Fällung mit 5% TCE (schon der Null-Wert liegt höher!). Eine begründete Erklärung hierfür können wir nicht geben; es wäre möglich, dass bei der direkten Fällung mit TCE gewisse Anteile der an sich löslichen Fraktion am ausgefallenen Casein adsorbiert bleiben, während diese Adsorption beim Umweg über die isoelektrische Fällung vermieden wird. Die gefundene Diskrepanz bestätigt die von uns auch sonst gemachte Beobachtung, dass die Höhe des Plateaus der NPN-Abspaltungskurven auch bei ein und derselben TCE-Konzentration etwas von den Fällungsbedingungen abhängt.

Aus Figur 4 geht im weiteren hervor, dass die Molkenalbumose und der in TCE lösliche NPN offenbar – genauere Reaktionsgeschwindigkeitsbestimmungen vorbehalten – gleichzeitig entstehen, und dass der letztere einen Teil der ersten darstellt. Erste elektrophoretische und chromatographische Versuche haben übrigens ergeben, dass auch die Molkenalbumose (d. h. das, was bei isoelektrischer Fäl-

lung einer gelabten Na-Caseinatlösung in Lösung bleibt) aus mehreren Komponenten besteht. Die Abklärung der Frage, ob und wie weit sich die Molkenalbumose von der in 2% TCE löslichen NPN-Stoffmischung unterscheidet, ist in Angriff genommen worden.

Die NPN-Abspaltung und die Frage nach der Primärreaktion der Casein-Labung.

Ist die Reaktion, welche die NPN-Verbindung in Freiheit setzt, dieselbe wie die, welche Calciumcaseinat unlöslich macht? D. h. messen wir wirklich die Geschwindigkeit der gesuchten Primärreaktion, oder handelt es sich vielleicht um eine Reaktion, die neben der Primärreaktion herläuft, aber mit ihr direkt nichts zu tun hat? Diese Frage können wir heute noch nicht mit Sicherheit beantworten. Aber es spricht viel für die erste Möglichkeit, wenig oder nichts – nach unsern derzeitigen Kenntnissen wenigstens – für die zweite.

Für Identität der NPN-Abspaltungs- und der Primärreaktion spricht einmal die allgemeine Form unserer Kurven. Auf alle Fälle muss sich unsere Reaktion direkt am nativen Casein abspielen und nicht etwa an dem Produkt oder den Produkten der Primärreaktion, denn dann wäre der Umsatz pro Zeiteinheit nicht am Anfang am grössten, sondern würde während einer Induktionsperiode ansteigen, ähnlich wie das bei der Sekundärreaktion, der Flockung des Ca-Caseinates, der Fall ist. Für Identität spricht auch die Tatsache, dass wir nie Gerinnung vor Abschluss der NPN-Abspaltung beobachten konnten.

Es ist von einer ganzen Reihe von Proteasen bekannt, dass sie ebenfalls Milch zur Gerinnung bringen. Mit Pepsin, das beim natürlichen pH der Milch besonders ähnlich wie Lab wirkt, haben wir fast die gleichen NPN-Abspaltungskurven erhalten wie mit jenem. Da die Untersuchung zur Zeit auf weitere Proteasen ausgedehnt wird, sollen genauere Ergebnisse erst später im Zusammenhang mitgeteilt werden.

Durch *Cherbuliez & Baudet*¹⁾ wissen wir, dass der enzymatische Eingriff am α -Casein die Koagulation des Ca-Caseinat-Komplexes veranlasst. Die ohnehin unlöslichen Calciumsalze des β - und des γ -Caseins werden in der Milch durch das lösliche Calcium- α -Caseinat in Lösung gehalten (Schutzkolloid!). Durch die Einwirkung des Labes wird auch das letztere unlöslich, was die Ausfällung des Komplexes zur Folge hat. Wenn nun nicht α -Casein, sondern β - oder γ -Casein mit Lab den NPN abspalten sollten, dann könnte unsere Reaktion nicht die Primärreaktion sein. Wie der eine von uns (*N.*) mit *W. Keller*²⁾ festgestellt hat, spaltet aber α -Casein³⁾ tatsächlich in ähnlicher

¹⁾ *E. Cherbuliez & P. Baudet*, *Helv.* **33**, 1673 (1950).

²⁾ Publikation mit näheren Angaben ist in Vorbereitung.

³⁾ Gewonnen nach der Harnstoff-Methode von *H. J. Hipp*, *M. L. Groves*, *J. H. Custer & T. L. McMeekin*, *J. Dairy Science* **35**, 272 (1952).

Weise wie Gesamtcasein unter der Wirkung von Lab in 12-proz. TCE löslichen NPN ab. Ob das Material wirklich identisch ist mit dem, das man aus Gesamtcasein bekommt, muss allerdings erst noch abgeklärt werden. Ein erstes Präparat von β -Casein¹⁾ ergab unter gleichen Bedingungen keine NPN-Abspaltung. Ein zwingender Beweis für die Identität der NPN-Abspaltung und der Primärreaktion sind diese Feststellungen natürlich auch nicht.

Eine Beobachtung, die eher gegen die Identität zu sprechen scheint, ist die folgende: Wie *Nitschmann & Nägeli*²⁾ gefunden haben, altert lufttrockenes Säurecasein bei Zimmertemperatur im Laufe von Monaten oder Jahren. Dies zeigt sich dadurch, dass das Präparat, als Na-Caseinat bei pH 6,8–6,9 in Lösung gebracht, durch CaCl_2 in immer grösserem Masse ausgefällt wird, bis es sich schliesslich diesbezüglich genau wie ein gelabtes Casein verhält.

Dieser Calciumfällungstest wird besonders genau, wenn man die Menge des unter Standardbedingungen³⁾ durch CaCl_2 ausgefällten Caseins in Abhängigkeit von der CaCl_2 -Konzentration bestimmt. In Fig. 5 ist das Verhalten von frischem und gealtertem Säure-Casein sowie von Labcasein wiedergegeben.

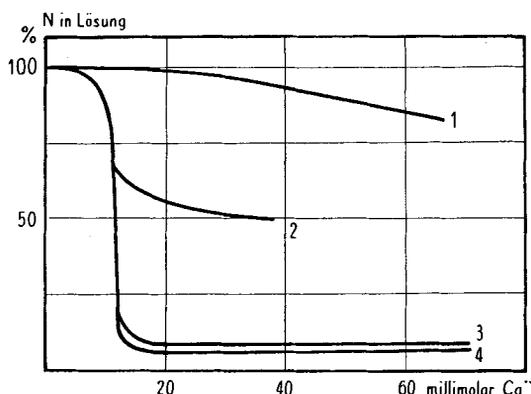


Fig. 5.

Fällbarkeit von Casein durch Calcium in Abhängigkeit von seinem Alter.

Kurve 1: Frisches Säurecasein.

Kurve 2: Dasselbe Casein nach 1 Jahr Lagerung bei Zimmertemperatur und 75% relativer Feuchtigkeit.

Kurve 3: Dasselbe Casein nach 2½ Jahren Lagerung unter den gleichen Bedingungen.

Kurve 4: Gelabtes Casein (Paracasein).

Dieser merkwürdige und noch unerklärte Alterungseffekt wurde bei allen unseren Caseinpräparaten gefunden (sofern sie eben alt genug wurden), unter anderem auch bei einem reinen α -Casein sowie bei einem Casein nach *Hammarsten* der Firma *Merk*, Darmstadt. Zu-

¹⁾ Siehe Anm. 3, S. 1964.

²⁾ Siehe *P. Nägeli*, Untersuchungen zum Problem der Labwirkung auf Casein. Diss., Bern 1951.

³⁾ Siehe *Hs. Nitschmann & W. Lehmann*, *Helv.* **30**, 804 (1947).

erst vermuteten wir, dass es sich um einen langsamen Angriff durch das proteolytische Enzym der Milch, welches sich bekanntlich in allen Caseinpräparaten befindet¹⁾, handle. Dies scheint nicht ganz ausgeschlossen, da lufttrockenes Casein ja noch etwa 14 % Wasser enthält. Wir mussten diese Vermutung aber fallen lassen, da Casein, bei dem wir die Protease durch Erhitzen in Lösung auf 80° zerstört hatten, ebenso alterte, und da die Alterung auch beim Lagern im gut evakuierten Exsikkator neben P₂O₅ nicht unterbunden wird.

Das 2 1/2 Jahre alte Casein, dessen Calciumfällungskurve (Nr. 3 in Fig. 5) sich praktisch nicht von der eines Labcaseins unterscheidet, wurde nun daraufhin untersucht, ob es unter der Einwirkung von Lab noch NPN abspaltet oder nicht, und zwar unter den Bedingungen des Versuchs 1 in Figur 2. Die erhaltene (nicht abgebildete) Kurve deckt sich fast vollständig mit derjenigen des frischen Caseins. Der NPN stieg innerhalb einer Stunde von 0,34 auf 2,18 % an, um dann über Stunden fast konstant zu bleiben.

Wir sehen nur zwei Möglichkeiten, dieses Versuchsergebnis zu erklären. Ist die Alterungsreaktion dieselbe wie die Primärreaktion der Labung (da sie beide das Ca-Salz des α -Caseins unlöslich machen), dann kann die NPN-Abspaltung nicht die Primärreaktion sein. Die Alterungsreaktion könnte aber auch nichts mit der Primärreaktion der Labung zu tun haben und ihr nur darin gleichen, dass sie das Casein ebenfalls Calcium-empfindlicher macht. In diesem Falle kann die NPN-bspaltende Primärreaktion natürlich auch am gealterten Casein immer noch eintreten. Wir halten eher die zweite Erklärung für richtig, weil zwei verschiedene chemische Eingriffe die Löslichkeit des Caseins ganz gut in ähnlicher Weise beeinflussen könnten. In Ermangelung einer sicheren Entscheidung bleibt auch die Frage, ob die NPN-Abspaltungsreaktion identisch mit der Primärreaktion ist, vorerst noch offen.

Die hier untersuchte Spaltungsreaktion besitzt auch noch Interesse wegen ihrer grossen Ähnlichkeit mit anderen Reaktionen, bei denen ebenfalls in spezifischer Weise Peptide von Proteinmolekeln abgetrennt werden. Wir denken z. B. an die Aktivierung von Profermenten (Pepsinogen, Trypsinogen, Chymotrypsinogen), an die Überführung von Ovalbumin in Plakalbumin und besonders an die kürzlich gefundene Abspaltung von Peptiden aus Fibrinogen unter der Wirkung von Thrombin²⁾. Die letztgenannte Reaktion wird ja heute als direkt verantwortlich für die Blutgerinnung angesehen, die dadurch in unmittelbare Nähe zur Milchgerinnung rückt.

¹⁾ R. C. Warner & E. Polis, Am. Soc. **67**, 529 (1945).

²⁾ K. Bailey, F. R. Bettelheim, L. Lorand & W. R. Middlebrook, Nature **167**, 233 (1951); L. Lorand, Nature **167**, 992 (1951); Biochem. J. **52**, 200 (1952); L. Lorand & W. R. Middlebrook, Biochem. J. **52**, 196 (1952); F. R. Bettelheim & K. Bailey, Biochem. et Biophys. Acta **9**, 578 (1952).

Über die Natur der Spaltungsreaktion geben unsere Versuche natürlich keine Auskunft. Eine eventuelle Hauptvalenzspaltung (Peptid-, Ester- oder Phosphamidbindung¹⁾) direkt titrimetrisch erfassen zu wollen, erscheint aussichtslos: Auch wenn wir annehmen, dass im Momente der Gerinnung, wo die allgemeine, unspezifische Proteolyse praktisch überhaupt noch nichts verändert hat²⁾, durch die spezifische Reaktion 1 oder 2 neue saure Gruppen pro 100 000 Molgewichtseinheiten α -Casein neu gebildet worden sind, so ist das eben im Vergleich zu den 198³⁾ bereits vorhandenen verschwindend wenig. Man muss also auch mit der Möglichkeit rechnen, dass mindestens ein Teil der NPN-Körper gar nicht durch Hauptvalenzen gebunden ist und einfach dadurch frei wird, dass die sehr ausgeprägte Assoziations-tendenz des nativen α -Caseins durch die Primärreaktion herabgesetzt wird. Die Substratteilchen wären dann einem Bündel zu vergleichen, das auseinanderfällt, wenn das es zusammenhaltende Band durch-schnitten wird⁴⁾. Es ist zu hoffen, dass genaue Endgruppenbestim-mungen der Caseinfraktionen, insbesondere des gelabten α -Caseins⁵⁾ und der aus ihm abgespaltenen Peptide, Licht in den Chemismus der Spaltung bringen werden. Ob schliesslich bei der untersuchten Reak-tion, wie auch schon vermutet worden ist⁶⁾, ein Denaturierungsvor-gang mit im Spiele ist, könnte vielleicht durch die nun möglich ge-wordene genaue Bestimmung des Temperaturkoeffizienten der Reak-tionsgeschwindigkeit abgeklärt werden.

Diese Untersuchung ist in Zusammenarbeit der Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières (Institut National de la Recherche Agronomique, France), des *Theodor-Kocher*-Instituts und des Instituts für organische Chemie der Universität Bern ausgeführt worden. Wir danken der Verwaltungskommission des *Theodor-Kocher*-Institutes, dass sie es dem einen von uns (*Ch. A.*) mit Mitteln der *Rockefeller-Foundation* ermöglicht hat, während eines halben Jahres als Gast am genannten Institut zu arbeiten.

SUMMARY.

During the rennet curdling of milk, the amount of nitrogen (NPN) which is not precipitated by 12 % trichloroacetic acid (TCE) increases markedly. The course of this splitting reaction can be fol-lowed quantitatively. The NPN/time curves show clearly that a very

¹⁾ Eine Phosphamidspaltung ist durch die Untersuchung von *H. Holter & Si-Oh Li*, *Acta chem. Scand.* **4**, 1321 (1951), besonders wahrscheinlich gemacht worden. Dabei müsste es sich aber um die einseitige Spaltung einer Phosphatbrücke handeln, denn freie Phosphorsäure entsteht bei der Einwirkung von Lab auf Casein nicht. Siehe *H. Mattenheimer, Hs. Nitschmann & P. Zahler*, *Helv.* **35**, 1970 (1952).

²⁾ *Hs. Nitschmann & R. Varin*, *Helv.* **34**, 1421 (1951).

³⁾ *N. H. Hipp, M. L. Groves & T. L. McMeekin*, *Am. Soc.* **74**, 1679 (1952).

⁴⁾ Ähnliche Vorstellungen sind von *E. Cherbuliez & P. Baudet* (*Helv.* **33**, 1673 (1950)) entwickelt worden.

⁵⁾ Für nicht gelabtes α -Casein ist die Bestimmung bereits gemacht worden. *E. F. Mellon, A. H. Korn & S. Hoover* (*Am. Soc.* **75**, 1675 (1953)) fanden pro 100 000 Molge-wichtseinheiten 12 Amino-Endgruppen.

⁶⁾ *N. J. Berridge*, *Nature* **149**, 194 (1949).

specific reaction is involved which terminates before visible clotting occurs and which differs distinctly from the slow but general proteolytic breakdown effected by the enzyme.

Crystalline rennin acts in the same manner as commercial rennet products. Suspensions of native calcium phosphocaseinate and solutions of sodium caseinate of pH 6.8 (from acid casein) give similar curves. The maximum yield of NPN depends somewhat upon the substrate and its concentration, especially however upon the TCE concentration during the precipitation. The influence of this latter factor on the shape of the NPN/time curves has been investigated. On decreasing the TCE concentration from 12% to 2%, the NPN yield rises from 1.5–2% to approximately 4%. This figure agrees fairly well with those given for the so-called „Molkenalbumose“, the formation of which has also been quantitatively followed.

The NPN consists of more than one peptide. By varying the TCE concentration, a fractional precipitation is achieved. The NPN stems from the α -casein. None is split off from β -casein under the same conditions.

It is shown that the process which sets free the NPN is very probably (though not certainly) identical with the primary reaction of the rennet curdling of milk. This seems to open a way to directly measure the reaction velocity of the latter.

Bern, Theodor-Kocher-Institut und
Institut für organische Chemie der Universität;
Paris, Institut National de la Recherche Agronomique.

242. Untersuchungen über Ausscheidung und Retention von Oxalat bei der Ratte mit Hilfe ^{14}C -signierter Oxalsäure

von Karl Bernhard, G. Brubacher¹⁾ und H. Jaquet.

(13. X. 53.)

Menschlicher Harn enthält als normalen Bestandteil 2–6 mg% Oxalsäure. Sie wird vielfach als ein Produkt des intermediären Stoffwechsels aufgefasst, aus den Fetten, den Kohlenhydraten oder dem Eiweiss herkommend.

Im Pflanzenreich ist diese einfachste Dicarbonsäure verbreitet. Sie kann daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Grössere Mengen sind giftig. Es ist anzunehmen, dass leicht lösliche Oxalate im Darm zum Teil in Calciumoxalat umgewandelt werden und mit

¹⁾ Stipendiat der „Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie“.