

217. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch XIII¹⁾. Untersuchung der bei der Labung in Freiheit gesetzten Peptide²⁾

von Hs. Nitschmann und R. Henzi³⁾

(3. VIII. 59)

Einleitung

Es ist bekannt, dass bei der Einwirkung von Lab auf eine neutrale Na-Caseinat-Lösung sehr rasch, d. h. ungefähr in der Zeit, die benötigt würde, um unter gleichen Bedingungen Kuhmilch zur Koagulation zu bringen, eine kleine Menge Nichtprotein-Stickstoff (NPN) in Freiheit gesetzt wird. Dabei handelt es sich um ein Gemisch von Peptiden, die in Lösung bleiben, wenn man das Casein (bzw. Paracasein) durch Ansäuern bis zum isoelektrischen Punkt (pH 4,6–4,8) oder mit 2% Trichloressigsäure ausfällt⁴⁾. NITSCHMANN, WISSMANN & HENZI⁵⁾ haben 1957 in einer vorläufigen Mitteilung bekannt gegeben, dass es sich bei einem der Peptide um ein Glyko-Makropeptid mit einem beträchtlichen Gehalt an Galaktose, Glucosamin und Neuraminsäure handelt. Sie haben auch darauf hingewiesen, dass die Abtrennung dieses extrem hydrophilen und selbst in 12-proz. Trichloressigsäure löslichen Peptides für die verminderte Löslichkeit des Calciumsalzes des zurückbleibenden Paracaseins verantwortlich sein könnte. Die übrigen Peptide müssen ein wesentlich kleineres Molekulargewicht haben, da sie im Gegensatz zum Makropeptid durch Cellophanmembrane diffundieren. Wir haben uns eine nähere Untersuchung dieser peptidischen Spaltprodukte des Caseins zum Ziele gesetzt und teilen im folgenden erste Ergebnisse unserer Arbeit mit.

I. Chromatographische Untersuchung des Peptidgemisches

1. *Gewinnung des Peptidgemisches.* Um zunächst möglichst alle Peptide zu erfassen, die durch die Primärreaktion in Freiheit gesetzt werden, trennten wir das Paracasein durch isoelektrische Fällung ab:

Eine 2-proz. Na-Caseinat-Lösung⁶⁾ mit pH 6,6–6,8 wurde bei 25° gelabt. Labungszeit 60 Min. Die Labmenge wurde so gewählt, dass nach dieser Zeit die Abspaltung des NPN sicher abgeschlossen war. Es wurde teils mit technischem Lab (HANSSENS Spezial Labpulver Nr. 7513), meist aber mit kristallisiertem Lab (Geschenk von Dr. BERRIDGE, Reading, England), gearbeitet. Unterschiede konnten keine festgestellt werden. Das Paracasein wurde nun durch Zusatz von 0,1-n. Salzsäure bis zu einem pH von 4,6 ausgefällt. Das klare Filtrat wurde sofort auf pH 7 neutrali-

¹⁾ Nr. XII dieser Serie: O. CLAESSON & Hs. NITSCHMANN, Optical Investigation of the Rennet Clotting of Milk, Acta Agricult. scand. **7**, 341 (1957).

²⁾ Diese Arbeit wurde durch einen Kredit des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung ermöglicht.

³⁾ Technische Mitarbeiterin war JUDITH ORBÁN.

⁴⁾ CH. ALAIS, G. MOCQUOT, Hs. NITSCHMANN & P. ZÄHLER, Helv. **35**, 1955 (1953). – CH. ALAIS, XIVth Internat. Dairy Congress, Rome 1956, Vol. II, p. 835. – W. KELLER: Die Abspaltung von Peptiden aus reinen Caseinfraktionen durch kristallisiertes Lab, Diss. Bern 1954.

⁵⁾ Hs. NITSCHMANN, H. WISSMANN & R. HENZI, Chimia **11**, 76 (1957). – R. HENZI: Zur Kenntnis der bei der Labgerinnung der Milch vom Casein abgetrennten Peptide, Dissertation, Bern 1957.

⁶⁾ Dreimal mit HCl umgefälltes und mit Alkohol und Äther entfettetes Kuhmilch-Casein.

siert und in einem Durchlauferhitzer kurz auf 80° erhitzt, um noch vorhandenes Ferment zu inaktivieren. Die Lösung wurde dann gefriergetrocknet. Zur Entfernung der Salze wurde der Trockenrückstand in wenig 90-proz. Phenol aufgenommen. Das hierbei nicht in Lösung gehende NaCl wurde abfiltriert. Die Peptide wurden hierauf aus der Phenollösung durch einen grossen Überschuss von trockenem Äther ausgefällt und getrocknet. Auf gleiche Weise wurde auch NPN aus elektrophoretisch einheitlichem α -Casein hergestellt, das nach der Harnstoff-Methode von HIPP *et al.*⁷⁾ gewonnen worden war.

2. Chromatographische Auftrennung des Peptidgemisches

Bedingungen: absteigend bei 20° ($\pm 1^\circ$) auf WHATMAN Nr. 1 und MUNKTELL CHR-100 mit n-Butanol/Eisessig/H₂O (4:1,5:5), obere Phase⁸⁾. Die bei 95° getrockneten Chromatogramme wurden durch Besprühen mit 0,1-proz. Ninhydrinlösung in Butanol und 20minütiges Erhitzen auf 110° entwickelt.

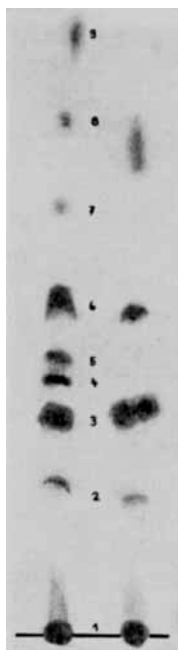


Fig. 1. Durch Lab aus Casein und α -Casein abgespaltene Peptide

Fig. 1 zeigt nebeneinander die Chromatogramme der Peptide aus unfraktioniertem Casein und aus α -Casein. Beim ersteren erkennt man sehr deutlich 9 Flecke. Der am Startpunkt verharrende Fleck hat stets einen mehr oder weniger ausgeprägten Schwanz, welcher verschwindet, wenn man den Fleck ein oder zweimal rechromatographiert. Die Anfärbbarkeit des Fleckes mit Ninhydrin nimmt dabei stark ab. Die Rf-Grenzwerte aus mehreren Versuchen sind in Tab. 1 zusammengestellt.

⁷⁾ H. J. HIPP, M. L. GROVES, J. H. CUSTER & T. L. McMEEKIN, *J. Dairy Science* **35**, 272 (1952).

⁸⁾ Von vielen untersuchten Lösungsmitteln hat nur dieses befriedigende Auftrennung der Flecke ergeben. Die Mischung wurde jeweils zuerst 1 Woche stehen gelassen. Aber auch mit diesem Lösungsmittel beobachteten wir gelegentlich starke Schwanzbildung, ohne dass wir die Ursache der Störung ermitteln konnten.

Die Peptide aus α -Casein geben ein sehr ähnliches aber einfacheres Chromatogramm wie diejenigen aus Gesamtcasein: es fehlen die Flecke Nr. 4, 5, 7 und 9. Ob die beiden Flecke Nr. 8 identisch seien, bleibe dahingestellt. Auch ist das Farbintensitätsverhältnis der Flecke Nr. 3 und 6 verschoben. Bei dem am Start verbleibenden Fleck handelt es sich um das Makro-Glykopeptid. Dialysiert man nämlich die Peptide vor der Chromatographie einige Tage aus, so bleibt nur dieser Fleck übrig. Durch Elution des Fleckes Nr. 1 und Mikro-N-Bestimmung wurde immer wieder gefunden, dass sein N ungefähr die Hälfte des gesamten NPN aus Casein ausmacht.

Tabelle 1. *Rf-Grenzwerte der Peptide aus Casein*

Frakt.-Nr.	Rf-Werte	Frakt.-Nr.	Rf-Werte	Frakt.-Nr.	Rf-Werte
1	0,00	4	0,37–0,39	7	0,58–0,61
2	0,22–0,24	5	0,40–0,42	8	0,69–0,72
3	0,28–0,34	6	0,45–0,47	9	0,80–0,90

3. Qualitative Aminosäurezusammensetzung der Peptide aus Casein (Tab. 2)

Die Chromatogramme von zweimal je 50 μ l einer 10-proz. NPN-Lösung aus unfractioniertem Casein (in Streifen auf MUNKTELL CHR-100 aufgetragen) wurden mit äusserst wenig Ninhydrin entwickelt, so dass die Lage der Flecke nur eben sichtbar wurde. Die Flecke wurden dann ausgeschnitten und mit Wasser unter Zusatz von sehr wenig NaOH (pH 8–9) eluiert. Wie üblich wurden dann die Eluate mit 6-n. HCl hydrolysiert und die Aminosäuren papierchromatographisch auf WHATMAN Nr. 1 mit n-Butanol/Eisessig/H₂O (4:1:1) ermittelt.

Tabelle 2. *Aminosäurezusammensetzung der Peptide aus Casein*

Aminosäure	Fraktions-Nr.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Leu/Ileu	sch	s sch	s sch	—	—	sch	—	—	s sch
Val	sch	s sch	s sch	—	—	sch	—	s sch	sch
Pro	sch	—	—	—	—	—	—	—	sch
Ala	st	sch	sch	s sch	—	sch	—	—	—
Glu/Threo	st	m	st	m	m	m	m	—	st
Ser	st	m	m	sch	m	m	m	m	m
Gly	st	—	—	—	—	—	—	—	—
Asp	sch	m	sch	m	m	st	m	m	st
Lys	m	sch	m	m	m	st	m	m	st

Die Verhältnisse der Intensitäten gelten nur innerhalb ein und derselben Fraktion (st = stark, m = mittel, sch = schwach, s sch = sehr schwach).

Es zeigt sich, dass die im Chromatogramm wandernden Peptide alle einfacher zusammengesetzt sind als das Makropeptid Nr. 1. Kein Peptid enthält aber weniger als 4 verschiedene Aminosäuren, und freie Aminosäuren fehlen vollständig. Ferner enthält kein Peptid eine Aminosäure, die nicht auch im Makropeptid vorhanden wäre. Andererseits kommen Prolin und Glycin nur im Makropeptid vor. Dagegen enthält jedes Peptid Serin, Asparaginsäure und Lysin. Was die Grösse der im Chromatogramm wandernden Peptide anbetrifft, so lassen sich auf Grund unserer Daten

höchstens Minimalgewichte angeben. Die wirklichen Gewichte müssen aber wesentlich kleiner sein als das des nicht wandernden Peptids, da die wandernden Peptide durch Cellophanmembran dialysieren, wenn auch langsam. Die Tatsache, dass das Makropeptid in 12-proz. Trichloressigsäure löslich ist, die kleineren Peptide aber fast nicht, dürfte durch den hohen Zucker- und Neuraminsäuregehalt des ersteren zu erklären sein. Die kleineren Peptide sind diesbezüglich bis jetzt nicht untersucht worden.

4. Zeitliche Verfolgung der Freisetzung der einzelnen Peptide

Versuchsbedingungen: 2,1 l einer 1,5-proz. Na-Caseinat-Lösung vom pH 6,8 wurden in Portionen von 300 ml tiefgefroren. Kurz vor Gebrauch wurden diese Portionen aufgetaut und bei 25° verschieden lang mit einer stets gleichen Menge Lab (80 ml einer Lösung 1:4000 von kristallisiertem Lab) behandelt. Die Peptid-Abspaltung war unter diesen Bedingungen erst nach ca. 60 Min. beendet. Nach Ablauf der vorgesehenen Labungszeit wurde die in einem Vorversuch als zur Fällung des Caseins erforderlich ermittelte Menge 10-proz. HCl in einem Guss unter sehr starkem Rühren zugegeben. Das klare Filtrat wurde sofort unter starkem Rühren im siedenden Wasserbad auf 80° erhitzt, 3 Min. auf dieser Temperatur gehalten und dann abgekühlt. Anschließend Gefriertrocknung und Befreiung von Salz mit Hilfe von Phenol wie zuvor beschrieben.

Auf diese Weise wurden die Peptide nach 0, 3, 6, 10, 20, 35, 80 Min. Labungszeit isoliert. Beim Versuch 0 Min. wurde der Caseinlösung statt der Lablösung ein gleiches Volumen Wasser zugesetzt.

Tabelle 3. Stickstoffverteilung auf die Peptide nach verschiedenen Labungszeiten

Labungszeit in Min.	% N bezogen auf den totalen Casein-N										
	Fraktions-Nr.										
	1	2	3	4	5	6	7	8+9	Rest	2-9	total
0	0,05	0,005	0,104	0,03	0,02	0,025	0,025	0,064	0,02	0,273	0,343
3	0,08	0,02	0,35	0,13	0,06	0,104	0,07	0,39	0,02	1,124	1,224
6	0,29	0,04	0,49	0,175	0,095	0,135	0,075	0,535	0,08	1,545	1,915
10	0,51	0,04	0,58	0,20	0,12	0,16	0,08	0,565	0,113	1,745	2,370
20	0,96	0,067	0,615	0,24	0,152	0,202	0,095	0,685	0,20	2,056	3,216
35	1,72	0,094	0,665	0,285	0,244	0,275	0,138	0,805	0,26	2,506	4,478
80	2,44	0,104	0,442	0,156	0,27	0,42	0,155	0,840	0,365	2,387	5,192
80	47,0	2,0	8,5	3,0	5,2	8,1	3,0	16,2	7,1	46,0	100

Zur Chromatographie auf MUNKTELL CHR-100 wurde von den NPN-Präparaten je 0,5 ml 2-proz. Lösung in Form ca. 6–8 cm langer Streifen aufgesetzt. Entwicklung wie zuvor. Die Flecke wurden ausgeschnitten und $\frac{1}{4}$ Std. bei 60° mit 87-proz. Essigsäure eluiert. In einem aliquoten Teil des Eluates wurde der Stickstoff mit der von uns früher modifizierten Methode von BOISSONAS & HASELBACH⁹⁾ bestimmt.

Ergebnisse s. Tab. 3 und Fig. 2 und 3. In Fig. 2 sind die Abspaltungskurven bis zu 20 Min. aufgetragen und in Fig. 3 bis zu 80 Min. (Abschluss der Primärreaktion), hier jedoch nur für Fleck Nr. 1 (Makropeptid) und die Summe der übrigen kleineren Peptide.

Es fällt auf den ersten Blick auf, dass die im Chromatogramm am Start verharrende Peptidfraktion eine ganz andere Kurve ergibt als die wandernden Peptide. Die letzteren erscheinen zu Anfang der Primärreaktion am schnellsten und ihre Abtrennung ist sehr bald, d. h. nach 20–30 Min. vollendet. Um innerhalb dieser Gruppe allfällig noch vorhandene Unterschiede bei der Freisetzungsgeschwindigkeit

⁹⁾ R. A. BOISSONAS & CH. HASELBACH, *Helv.* **36**, 576 (1953); Hs. NITSCHMANN & H. U. BOHREN, *Helv.* **38**, 1953 (1955).

festzustellen, war unsere Untersuchungstechnik zu wenig genau. Die am Start verbleibende Fraktion dagegen wird sicher nicht gleichzeitig mit den anderen Fraktionen abgetrennt; die Abtrennung ist bedeutend später abgeschlossen und zeigt dafür eine zwar kurze, aber deutlich erkennbare Induktionsperiode. Diese ist nicht durch eine Ungenauigkeit der Messung vorgetäuscht, denn sie wurde auch bei 2 vorgängigen Versuchen ganz deutlich gefunden, bei denen nur die Abspaltungsgeschwindigkeit des Makropeptides und der Summe der kleineren Peptide ermittelt wurde. Dieser Kurventeil erinnert an die Induktionsperiode, die man bei der Verfolgung der Sekundärreaktion (Aggregation der Caseinpartikel) in Magermilch mit Hilfe von Streulichtmessungen¹⁾ findet.

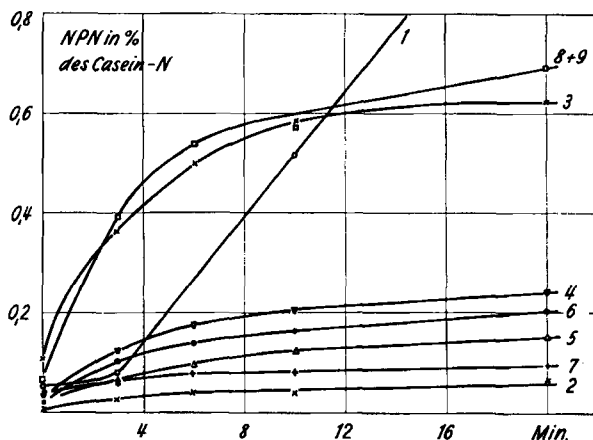


Fig. 2. Abspaltungsgeschwindigkeit der Peptide Nr. 1 bis 9

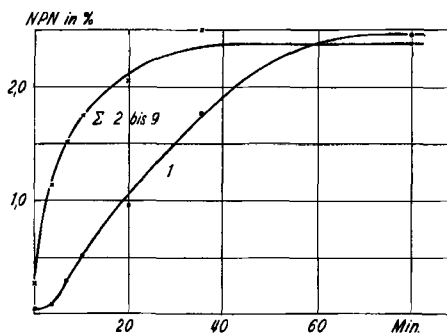


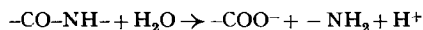
Fig. 3. Abspaltungsgeschwindigkeit des Makropeptides (1) und der übrigen Peptide (2 bis 9)

Betrachtet man die N-Anteile der einzelnen Fraktionen am NPN aus Säurecasein (letzte Zeile der Tab. 3), so sieht man, dass nach der das Makropeptid enthaltenden Fraktion Nr. 1 die Fraktionen Nr. 3, 5, 6 und 8 + 9 die grössten sind. Die Intensität der Ninhydrinblaufärbung ist kein Mass für die Stickstoffmenge.

Ein ganz besonders interessanter Umstand ist der, dass auch ohne Labeinwirkung (Zeit 0) alle 9 Flecke gefunden werden, wenn auch ihre N-Menge total nur 0,35% des Casein-Stickstoffes ausmacht, gegenüber ca. 5% nach abgeschlossener Primärreaktion. Hierfür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

Einmal könnte es sein, dass unsere Ausgangs-Caseinlösung nicht ganz frei von proteolytischen Fermenten war, die entweder aus der Milch selbst oder von Bakterien herkommen könnten. Solche Fermente könnten auf das Casein ähnlich wie das Lab einwirken, denn es ist ja bekannt, dass eine Reihe anderer Proteasen ebenfalls Milchgerinnung auslösen.

Die andere Deutungsmöglichkeit hängt zusammen mit der Frage, wie die Freisetzung der wenigstens 9 Peptide (5 bei α -Casein) vor sich geht. Man könnte zunächst annehmen, dass jedes Peptid durch einen proteolytischen Schnitt von einer der Komponenten des Casein-Komplexes abgetrennt werde. Diese Annahme muss aber fallen gelassen werden, wenn man bedenkt, wie ausserordentlich wenig titrierbare Gruppen während der Primärreaktion in Freiheit gesetzt werden. An Versuchen, ihre Zahl zu bestimmen, hat es nicht gefehlt (siehe z. B. HOLTER's¹⁰) titrimetrische Versuche), aber erst ganz kürzlich ist es GARNIER¹¹) gelungen, wirklich zuverlässige Messungen durchzuführen. Mit Hilfe eines hochempfindlichen pH-Meters konnte er die ausserordentlich kleinen pH-Verschiebungen während der Primärreaktion zeitlich verfolgen, welche durch die Freisetzung von Protonen nach der Gleichung:



in einer neutralen Na-Caseinat-Lösung bewirkt werden. Bei pH 6,95 werden pro g Casein (nicht fraktioniert) ca. $1,5 \cdot 10^{-6}$ Mole H^+ frei. Vorausgesetzt, dass es sich um eine Proteolyse handelt, dürfte das pK der freigesetzten NH_2 -Gruppen, da keine freien Aminosäuren entstehen, nach J. YON¹²) um 7 liegen. Bei pH 7 wäre also nur die Hälfte der $-\text{NH}_3^+$ dissoziiert, und die Menge der effektiv gespaltenen Peptidbindungen würde demnach ca. $3 \cdot 10^{-6}$ Mole pro g Casein betragen. Nimmt man für die Caseinmolekel ein mittleres Molgewicht von 15000 an¹³), so ergibt die Rechnung, dass auf ca. 22 Caseinmolekeln nur eine einzige Bindung gespalten wird (Peptid- oder Esterbindung)¹⁴). Das würde auch bedeuten, dass das eigentliche Substrat der Primärreaktion nur 4–5% des ganzen Casein-Komplexes ausmacht. Es scheint somit ausgeschlossen, dass jedes der 9 Peptide, die aus dem Gesamtcasein, bzw. der 5 Peptide, die aus dem α -Casein bei der Primärreaktion freigesetzt werden, hydrolytisch abgespalten worden ist. Man kommt vielmehr zu folgendem Bild:

Die Komponenten des Caseinsystems haben, wie aus den Beobachtungen vieler Autoren hervorgeht, eine sehr starke Tendenz zur Bildung von gemischten Assoziaten. Sie ist besonders ausgeprägt bei Gegenwart von Calcium (Milch-Bildung), aber sie ist auch in Na-Caseinat-Lösungen wirksam, um so mehr je tiefer das pH ist¹⁵). Im reversiblen Assoziationsgleichgewicht sind zwar die Einzelkomponenten zum Teil auch frei vorhanden, aber offenbar stellt sich das Gleichgewicht so rasch ein, dass unter den Bedingungen, unter denen das Casein als Ganzes unlöslich wird (z. B.

¹⁰) H. HOLTER, *Biochem. J.* **255**, 160 (1932).

¹¹) J. GARNIER, *C. r. Séances Acad. Sci.* **247**, 1515 (1958).

¹²) J. YON, *Bull. Soc. Chim. biol.* **39**, 1163 (1957).

¹³) P. H. VON HIPPEL & D. F. WAUGH, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4311 (1955).

¹⁴) Die Betrachtung wäre hinfällig, wenn Bindungen gespalten würden, bei denen nur neutrale Gruppen frei werden. Als solche kommen höchstens Glykosidbindungen in Frage. Eine Glykosidasewirkung des Labes ist aber bisher nie gefunden worden.

¹⁵) Ein detaillierteres Bild dieser Assoziation hat kürzlich D. F. WAUGH entwickelt, *Faraday Soc. Disc.* **1958**, Nr. 25, 186.

pH 4,7 in wässrigem Milieu), die Niederschlagsbildung alle Komponenten erfasst. Es scheint nun, als ob in diese Fällungen nicht nur die bis heute bekannten Komponenten α (bzw. α_s und k oder α_1 und α_2), β und γ , sondern auch eine Reihe grösserer und kleinerer Peptide, die in der Milch vorhanden sind, eintreten. Selbst das übliche mehrfache Umfällen des Caseins ist offenbar nicht imstande, diese Peptide zu eliminieren. Immerhin dürfte ihre Menge und vielleicht auch ihr Verhältnis durch solche Operationen mehr oder weniger verändert werden. Tatsächlich schwankt die Quantität des bei der Labung abgespaltenen NPN von einem Caseinpräparat zum anderen ziemlich stark. Bei der Fraktionierung des Caseins mit Harnstoff nach HIPP *et al.*⁷⁾ gehen der α -Fraktion die Peptide Nr. 4, 5, 7 und 9 verloren, weshalb deren Peptidgemisch ein einfacheres Chromatogramm ergibt.

Es ist aber wahrscheinlich, wenn auch nicht sicher, dass wenigstens eines der Peptide (Nr. 1, 2, 3, 6 oder 8) durch einen proteolytischen Prozess abgetrennt wird. Welches, können wir nicht sagen. Gerade für das Makropeptid ist die Wahrscheinlichkeit nicht besonders gross, da es erst nach einer Induktionsperiode und dann noch bedeutend langsamer als die übrigen Peptide freigesetzt wird. Es ist sogar noch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass von den Molekeln des eigentlichen Labsubstrates gar nichts abgetrennt wird, sondern dass vielleicht nur ein Ring geöffnet wird. Auf alle Fälle wird irgendeine Komponente des Caseinkomplexes (k oder eine Unterfraktion von k), die für die grosse Assoziationstendenz des Ganzen verantwortlich ist, in einer Weise verändert, dass sie diese spezielle Eigenschaft weitgehend verliert. Eine Folge davon ist, dass die Peptide nicht mehr in die durch Säure oder Calcium bewirkten Fällungen des Caseins eingehen, sondern in der überstehenden Lösung verbleiben. Die Bildung grosser Mizellen aus α -, β - und γ -Casein bei Gegenwart von Calcium ist zwar nach der Labung immer noch möglich¹⁶⁾, aber das dabei resultierende Kolloid ist sehr labil und flockt bei Überschreitung einer ganz bestimmten kritischen Calcium-Konzentration aus. Die grosse Labilität des Kolloids dürfte eben daher rühren, dass das äusserst hydrophile Glyko-makropeptid aus den Mizellen ausgetreten ist, bzw. nicht mehr in sie eingebaut wird. Da dieses Makropeptid von besonderem Interesse scheint, haben wir es genauer untersucht.

II. Untersuchung des Glyko-makropeptides

1. *Herstellung der Präparate.* Zur Isolierung des Makropeptides wurden zwei Methoden angewandt:

a) Papier-Chromatographische Abtrennung aus dem Peptidgemisch. Das gesamte Peptidgemisch wurde der Papierchromatographie mit der abgeänderten PARTRIDGE-Mischung unterworfen. Die am Start verbliebenen Flecke wurden ausgeschnitten und bei pH 7,5 eluiert. Das Eluat wurde unter Zusatz von Merthiolat bei 1° mindestens 4 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert. Der Rückstand wurde nun papierchromatographisch geprüft. Falls noch wandernde Peptide erkennbar waren, wurde die Dialyse wiederholt. Schliesslich wurde das Makropeptid gefriergetrocknet.

¹⁶⁾ Der eine von uns (H. N.) hat mit LEBER (siehe J. P. LEBER, Elektronenmikroskopische Untersuchungen an natürlichen und künstlichen Calciumcaseinatsolen und -gelen, Diss., Bern 1953) gezeigt, dass bei schrittweiser Erhöhung der Ca-Konzentration in einer Na-Paracaseinat-Lösung zuerst dieselben kugelförmigen, elektronenmikroskopisch sichtbaren Teilchen entstehen, die für natürliche Milch oder künstliche Ca-Caseinat-Suspensionen typisch sind. Die Ausbildung dieser Teilchen bis zu einem Gleichgewichtszustand braucht – wie Streulichtmessungen gezeigt haben – eine gewisse Zeit, während die Koagulation nachher praktisch momentan verläuft.

b) Direkte Isolierung mit 12% Trichloressigsäure aus gelabtem Casein. Frisch hergestellte 2-proz. Na-Caseinat-Lösung mit pH 6,9–7,0 wurde bei 25° bis zur Beendigung der Primärreaktion gelabt (10 Min.). Dann wurde das Casein durch Zusatz eines gleichen Volumens 24-proz. Trichloressigsäure ausgefällt. Das klare Filtrat wurde dreimal mit Äther extrahiert. Die immer noch stark saure Lösung wurde nun auf pH 7 gebracht und zur Inaktivierung der letzten Fermentspuren 10 Min. auf 80° erwärmt. Anschliessend wurde unter Merthiolatzusatz dialysiert, bis im Papierchromatogramm kein wanderndes Peptidmaterial mehr zu finden war, und gefriergetrocknet.

2. *Analytische Untersuchung.* Die nach den beiden Methoden a und b hergestellten Präparate des Glyko-makropeptides wurden mit der Papierelektrophorese untersucht. Bei pH 4,4, 7,0 und 9,0 (Phosphatpuffer) war immer nur ein anodisch wandernder Fleck zu sehen, gleichgültig, ob mit Amidoschwarz im Bad oder mit Ninhydrin-Besprühung entwickelt wurde. Auch photometrische Ausmessung der Flecke liess keine Unterfraktion erkennen.

Die Dinitrophenylderivate der Peptide wanderten bei den genannten drei pH in der Papierelektrophorese ebenfalls als einheitliche Flecke nach der Anode.

Es wurden drei Präparate quantitativ analysiert: 1. GMP(a)1: Glyko-makropeptid nach Methode a hergestellt; 2. GMP(a)2: wie 1, neue Herstellung; 3. GMP(b)1: Glyko-makropeptid nach Methode b hergestellt.

Tab. 4 enthält die Stickstoff-, Phosphor- und Zuckergehalte in % der drei über P₂O₅ getrockneten Präparate nebst den Werten des 1957⁵⁾ analysierten Präparates GMP(b)1957).

Tabelle 4. *Zusammensetzung verschiedener Präparate des Glyko-makropeptids*

Präparat	g in 100 g trockener Substanz					
	N	P	Galaktose ^{a)}	Glucosamin ^{b)}	Neuraminsäure ^{c)}	Summe Gal. + Gluc. + Neuraminsäure.
GMP(a)1	12,95	0,4	5,9	1,74	3,6	11,24
GMP(a)2	12,24	0,26	4,4	1,75	4,9	11,03
GMP(b)1	10,86	0,25	9,4	3,35	10,0	22,72
GMP(b)1957	11,4	0,57	15,2	4,3	11,4	30,9

^{a)} Nach H. E. SCHULTZE, R. SCHMIDTBERGER & H. HAUPT, *Biochem. Z.* **329**, 490 (1958), bestimmt.

^{b)} Nach G. BLIX, *Acta chem. scand.* **2**, 467 (1948), bestimmt.

^{c)} Nach P. BOEHM, S. DAUBER & L. BANMEISTER, *Klin. Wochenschr.* **32**, 289 (1954), bestimmt.

Die grossen Unterschiede besonders bei den Werten der drei Kohlehydrate, Galaktose, Glucosamin und Neuraminsäure sind sehr auffallend.

Die Aminosäureanalysen (s. Tab. 5) wurden mit einem automatisch registrierenden Chromatographen nach MOORE, STEIN & SPACKMAN (Konstruktion von BECKMAN INSTRUMENTS, INC.) durch Dr. ROLF WEBER an der Anstalt für organische Chemie der Universität Basel gemacht. Jede Analyse wurde doppelt ausgeführt, wobei die Hydrolyse mit 6-n. HCl bei 110° einmal 24 Std. und das andere Mal 72 Std. dauerte. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte oder extrapolierte Werte bei solchen Aminosäuren, die während der Hydrolyse einem Abbau unterliegen. Bei der Hydrolyse scheiden sich stets dunkelbraune Flocken ab, die ein Zersetzungsprodukt der Neuraminsäure darstellen. Es ist nicht abgeklärt, ob bei dieser Zersetzung auch Aminosäuren in Mitleidenchaft gezogen werden.

Tabelle 5. *Aminosäuregehalte der drei Glyko-makropeptid-Präparate in % der Summe der Aminosäuren*

	GMP(a)2	GMP(a)1	GMP(b)1	Mittel für GMP(a)1 und GMP(b)1	Mol- verhältnisse der Mittelwerte
NH ₃	1,45*)	1,65*)	1,33*)	1,49*)	6,12*)
Lys	6,55	6,1	6,15	6,13	2,94 (3)
Asp	7,7	7,6	8,35	8,0	4,2 (4)
Thre	13,9	17,0	16,9	16,95	9,95 (10)
Ser	7,5	7,9	7,9	7,9	5,26 (5)
Glu	19,2	19,2	18,8	19,0	9,03 (9)
Pro	12,3	11,9	11,8	11,85	7,23 (7)
Gly	1,20	0,98	1,06	1,02	0,95 (1)
Ala	5,75	6,1	6,1	6,1	4,8 (5)
Val	8,8	9,7	8,95	9,3	5,6 (6)
Ileu	10,2	10,5	10,6	10,55	5,65 (6)
Leu	3,1	2,0	1,92	1,96	1,02 (1)
Hist	0,41	—	0,1	—	(57)
Arg	0,77	—	0,05	—	
Tyr	0,54	—	0,05	—	
Phe	0,9	—	0,05	—	
g Peptid in 100 g Substanz . . .	69,7	68,45	61,6		
*) Werte für 72 Std. Hydrolyse. Die Werte bei 24-stündiger Hydrolyse sind um ca. 20% kleiner.					

Die 1957 mitgeteilten Analysenresultate⁵⁾ finden sich qualitativ bestätigt, indem wieder die gleichen 11 Aminosäuren sowie NH₃ gefunden wurden. Die Werte weichen aber von den früher erhaltenen zum Teil beträchtlich ab, was wohl auf die Ungenauigkeit der damals angewandten Papierchromatographie zurückzuführen ist. Von den drei neu untersuchten Präparaten scheint GMP(a)2 am wenigsten rein zu sein, da es nicht zu übersehende Mengen Histidin, Arginin, Tyrosin und Phenylalanin enthält, die bei GMP(a)1 nicht und bei GMP(b)1 nur in Spuren gefunden wurden. Die Werte für die 11 wesentlichen Aminosäuren des unreineren GMP(a)2 weichen trotzdem nur wenig von denjenigen der beiden anderen Präparate ab. Um die Molverhältnisse der Aminosäuren zu erhalten, wurden die Mittel der recht gut übereinstimmenden Werte von GMP(a)1 und GMP(b)1 (vierte Zahlenkolonne) mit dem Faktor 70/Molgewicht multipliziert, der so gewählt war, dass für die am geringsten vertretenen Aminosäuren Glycin und Leucin etwa 1 herauskam. Nach diesen Verhältniszahlen scheint das Makropeptid 57 Aminosäurereste zu enthalten, mit 13 scitenständigen Carboxyl-, 3 ε-Amino- und 15 alkoholischen Hydroxyl-Gruppen¹⁷⁾.

¹⁷⁾ Dass mit der Dinitrophenyl-Methode keine endständige α-Aminogruppe nachgewiesen werden kann, wurde schon 1957 mitgeteilt⁵⁾. Die Carboxyl-Endgruppenbestimmung mit Carboxypeptidase hat ein sehr komplexes Bild ergeben. Auch bei kurzen Abbauzeiten werden mehrere Aminosäuren abgetrennt, vor allem Valin, Threonin und Alanin. Siehe H. U. BRÜGGER, Beiträge zur Kenntnis der Chemie des Caseins und des Labcaseins, Diss., Bern 1959.

Auf Grund dieser Zahlen errechnet sich für den Peptidteil ein Molgewicht von 5957. Dieser Wert steht einigermaßen in Übereinstimmung mit dem früher aus der Sedimentations- und der Diffusionskonstante erhaltenen Molgewicht für das ganze Glyko-makropeptid von ca. 8000.

Die weitgehend übereinstimmende Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Präparate des Makropeptids ist um so bemerkenswerter, als sie sich in bezug auf die Zuckergehalte und sogar auf den Phosphor sehr beträchtlich unterscheiden. Ein einheitliches und wohldefiniertes Peptid scheint also verschiedene Mengen von Zucker und vielleicht auch Phosphorsäure tragen zu können.

Ob primär in der Milch alle Molekeln des Glyko-makropeptides in bezug auf die nichtpeptidischen Bausteine identisch seien, oder ob es dort schon mehrere Arten gebe, bleibe dahingestellt. Letzteres ist durchaus denkbar, und chromatographische Untersuchungen an Dowex 50 von JOLLES & ALAIS¹⁸⁾ machen es sogar wahrscheinlich. Ein ähnlicher Fall liegt ja bei den γ -Globulinen des Blutplasmas vor, die sich im wesentlichen auch nur durch ihren Gehalt an gebundenen Zuckern und Neuraminsäure unterscheiden¹⁹⁾.

Andererseits haben wir auch eine Reihe von Beobachtungen gemacht, die zeigen, dass das Peptid in Lösung recht leicht Veränderungen erleidet, bei welchen mindestens der Neuraminsäuregehalt verändert wird. Bei Versuchen zur chromatographischen Reinigung der Peptidpräparate auf Diäthylaminoäthyl-Cellulose (DEAE-Cell.)-Säulen stellten wir öfters fest, dass das Material, das als einheitlicher Gipfel durchgelaufen war, nach Dialyse und Gefriertrocknung beim Rechromatographieren unter genau gleichen Bedingungen zwei scharf getrennte Gipfel ergab, die sich auch im Neuraminsäuregehalt unterschieden. Es muss angenommen werden, dass Neuraminsäure abgespalten wurde, während das Peptid gelöst war, möglicherweise unter Mitwirkung von Mikroorganismen. Diese Verhältnisse sind aber bisher von uns noch nicht eingehend genug untersucht worden, als dass wir jetzt schon näher darauf eingetreten möchten.

In Tab. 5 ist zuunterst noch angegeben, wieviele g Rein-Peptid die Aminosäureanalyse pro 100 g trocken eingewogenes Präparat ergeben hat. Diese Zahlen wurden wie folgt erhalten: Die direkt erhaltenen Werte g Aminosäure pro 100 g Roh-Peptid (in der Tab. nicht aufgeführt) wurden für die 11 wesentlichen Aminosäuren addiert; das für die Peptidbildung aus den Aminosäuren abzuziehende Wasser wurde auf Grund der aufgerundeten Molverhältnisse (letzte Kolonne in Tab. 5) berechnet. Rechnet man zu diesen Gehalten an Rein-Peptid noch die drei Zucker dazu, so bleibt die Summe immer noch weit unter 100% (79,7; 80,7; 84,3). Worauf dieser grosse Fehlbetrag zurückzuführen ist, können wir nicht sagen. Andere Zucker als die angegebenen konnten bei der papierchromatographischen Untersuchung des Hydrolysates nicht gefunden werden. Es ist denkbar, dass mindestens unsere Werte für Neuraminsäure zu klein sind. Die quantitative Bestimmung der Neuraminsäure in oder neben Protein ist jedenfalls ein Problem, das noch nicht befriedigend gelöst ist. Wir mussten uns davon überzeugen, dass die Bestimmung reiner, freier Neuraminsäure

¹⁸⁾ P. JOLLES & C. ALAIS, *Biochim. biophys. Acta* **34**, 565 (1959). Wir danken den Autoren, dass sie uns Einsicht in ihre Arbeit noch vor dem Erscheinen im Druck gegeben haben. Die Ergebnisse ihrer Aminosäureanalysen sind übrigens sehr ähnlich wie die unsrigen.

¹⁹⁾ Siehe hierzu: M. KNEDEL & I. SPERL, *Blut* **5**, 65 (1959).

mit BIAL's Reagenz durch die Anwesenheit von Protein wie Serumalbumin stark gestört wird. Solange es nicht möglich ist, die Summe der erfassten Bestandteile auf 100% zu bringen, müssen Analysenwerte wie die der Tab. 5 noch als vorläufig betrachtet werden.

Wir danken Herrn Dr. ROLF WEBER, Basel, für die Ausführung der Molekulargewichtsbestimmung und der quantitativen Aminosäureanalysen.

SUMMARY

In a neutral sodium caseinate solution the enzyme rennin quickly sets free a number of peptides. They are found in the supernatant, when, after the action of the enzyme, the paracasein is precipitated at pH 4,7.

The mixture of these peptides could be separated by paper chromatography into nine fractions. One of the fractions does not move with the solvent used by the authors. It contains about 50% of the total nonprotein nitrogen (NPN) set free by the rennin. Its size is such that diffusion through cellophane membranes is impossible. The other eight peptides are dialysable. For all the nine peptides the amino acid composition was determined qualitatively by paper chromatography. None of the smaller peptides contains an amino acid not also found in the macropeptide.

The velocity of appearance of the peptides during the primary enzymatic phase of the reaction has been determined quantitatively by micro nitrogen analysis of the spots cut out of paper chromatograms, plotted against time of enzymeaction. The macropeptide gives quite a different curve than the smaller peptides. It appears much more slowly than these and only after a short induction period.

From α -casein only five peptides are set free by rennin, one of them being the macropeptide.

Considerations are presented which lead to the assumption that not all of these peptides can be split off by a proteolytic process. Some of the peptides are probably constituents of the milk and take part in the complex formation of the casein components, which proceeds any precipitation.

The macropeptide was isolated by two methods. The preparations behaved uniformly in paper electrophoresis at three pH's. One preparation was tested in the ultracentrifuge and the diffusion cell. It appeared to be monodisperse with a molecular weight of about 8000.

Three preparations of the macropeptide were analyzed quantitatively. Besides amino acids they all contained phosphoric acid and considerable amounts of galactose, glucosamine and neuraminic acid. The content of these three components was quite variable, whereas the amino acid composition was found to be almost constant.

It is assumed that the peptide moiety is the same for all the macropeptide molecules, which however may contain more or less of the two sugars and of neuraminic acid, according to the origin, the method of preparation and the intermediate treatment of the preparation. The macropeptide contains eleven different amino acids and probably about 57 amino acid residues per molecule.

This glyco-macropeptide is extremely hydrophilic and soluble even in 12% trichloroacetic acid. Its release from the casein complex as a consequence of the rennin action may be responsible for the instability of the colloidal dispersion of the calcium caseinate particles in natural or in reconstituted milk.

Institut für organische Chemie und Theodor-Kocher-Institut
der Universität Bern