

Mitteilung aus dem Analytischen Laboratorium
(Vorstand Prof. Dr. M. Straumanis) der Universität Riga, Lettland

Hitzedenaturierung des Kaseins

Von B. Jirgensons

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 10. November 1943)

Im Zusammenhang mit den früheren Arbeiten über die Entrollung der korpuskularen Proteinmoleküle bei Desaminierung,¹⁾ wurde die Hitzedenaturierung des Kaseins untersucht. Die Denaturierung wurde mit Hilfe der Viskositätsmessungen verfolgt. Es wurde festgestellt, daß schon beim Trocknen bei 100° das Kasein denaturiert wird, wobei die Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln sich verminderte²⁾ und die Viskosität sich erhöhte. Bei weiterer Erhitzung bis zu 135° wird Kasein sogar in 0,5*n* NaOH unlöslich.

Die Versuchsergebnisse.

Eine bestimmte Menge des Kaseins (Kasein nach Hammarsten von der Firma E. Merck, Darmstadt) wurde im Trockenschrank bei bestimmter Tempera-

Tabelle 1.

Löslichkeit des erhitzten Kaseins in verschiedenen Lösungsmitteln.

Erhitzungszeit und Temperatur	Lösungsmittel							
	0,01 <i>n</i> NaOH	0,1 <i>n</i> NaOH	10% CH ₃ COOH	10% CH ₃ CH(OH)- COOH	H. COOH (konz.)	0,05 <i>n</i> HCl	6 mol. CO(NH ₂) ₂	4 <i>n</i> KCNS
2 Stunden bei 80°	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich	löslich
2 Stunden bei 100°	schwer löslich	löslich	schwer löslich	schwer löslich	schwer löslich	schwer löslich	löslich	löslich
2 Stunden bei 125°	unlösl.	schwer löslich	unlösl.	unlösl.	schwer löslich	unlösl.	schwer löslich	schwer löslich
6 Stunden bei 130°	unlösl.	unlösl.	unlösl.	unlösl.	unlösl.	unlösl.	unlösl.	unlösl.

¹⁾ B. Jirgensons, J. prakt. Chem. **160**, 120 (1942); **161**, 181 (1943); **161**, 293 (1943); **162**, 224 (1943); **162**, 237 (1943).

²⁾ Einige Literaturangaben darüber in E. Sutermeister and F. Browne, Casein and its industrial applications, 2. ed. 1939; Vergl. auch A. v. Buzágh, Kolloid-Z. **49**, 185 (1929); H. F. Zoller, Science, **50**, 49 (1919); J. Gen. Physiol. **3**, 635 (1921).

tur erhitzt. Nach einer bestimmten Zeit wurde der Trocknungsverlust festgestellt und das Kasein in verschiedenen Lösungsmitteln zu lösen versucht. Die Löslichkeit verminderte sich mit der Trocknungstemperatur (vergl. Tabelle 1).

Der Trocknungsverlust betrug meistens 8,5 bis 14%. Diese Differenz wurde bei der Berechnung der Konzentration, falls diese nicht direkt bestimmt wurde, stets beachtet. Das bei 80° oder 100° getrocknete Kasein hat eine rein weiße Farbe, das auf 125° erhitzte war sehr schwach gelblich, und das auf 130° 6 Stunden erhitzte schwach gelblichbraun gefärbt.

Die erhitzten Kaseine wurden in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst, filtriert und die Viskosität der Lösungen mit einem Wi. Ostwald'schen Viskosimeter im Thermostat bei +25° gemessen. Einige Resultate sind in den folgenden Tabellen niedergelegt.

Tabelle 2.

Kasein, getrocknet 2 Stund. bei 100°. 2 g gelöst in 100 cm³ 0,02*n* NaOH. Viskositätsmessungen.

Konzentration <i>c</i> = g/Liter	Kasein, erhitzt bei 100°		Bei +15 bis 20° im Vakuum exsiccator getrocknetes Kasein
	$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$	η_{sp}/c	η_{sp}/c
20	0,882	0,0441	0,0298
10	0,435	0,0435	0,0350
5	0,219	0,0438	0,0378
2,5	0,128	0,0512	0,0398
1,25	0,070	0,0560	0,0410

Tabelle 3.

Kasein getrocknet 2 Stunden bei 100°. 2 g gelöst in 100 cm³ 10% CH₃COOH.

Konzentration <i>c</i> = g/Liter	Kasein, erhitzt bei 100°		Kasein, getrocknet im Vakuum bei +15 bis 20°	
	η_{sp}	η_{sp}/c	η_{sp}	η_{sp}/c
20	5,600	0,280	0,835	0,0417
10	1,598	0,159	0,404	0,0404
5	0,595	0,119	0,192	0,0384
2,5	0,261	0,104	0,095	0,0380
1,25	0,111	0,088	0,048	0,0384

Tabelle 4.

Kasein getrocknet 2 Stunden bei 125°. 1,2 g gelöst in 100 cm³ 0,1*n* NaOH.

Konzentrat. <i>c</i> = g/Liter	Kasein erhitzt auf 125°				Kasein ge- trocknet bei +80° 2 Tage nach der Auflös.
	1 Tag nach der Auflösung		2 Tage nach der Auflösung		
	η_{sp}	η_{sp}/c	η_{sp}	η_{sp}/c	η_{sp}/c
11	0,574	0,0521	0,462	0,0420	0,0341
5,5	0,334	0,0608	0,255	0,0464	0,0310
2,75	0,200	0,0728	0,151	0,0549	0,0296
1,37	0,115	0,0840	0,089	0,0647	0,0302
0,68	0,062	0,0912	0,050	0,0728	0,0310

Die Konzentration des Kaseins wurde durch Verdünnen mit Wasser (Tabelle 2 und 4) oder durch 10% Essigsäure (Tabelle 3) verändert. Die in den Tabellen 2 und 3 angegebenen Lösungen waren 1 Tag alt. In allen Fällen verminderte sich die Viskosität der Lösungen mit der Zeit.^{2a)}

Aus den Tabellen ist zu ersehen, daß die erhitzten Kaseine viel zähere Lösungen hatten als die bei Zimmertemperatur oder bei 80° getrockneten. Besonders groß sind die Unterschiede der essigsäuren Lösungen (Tabelle 3). Die Lösung des auf 100° erhitzten Kaseins wurde durch ein Glasfilter filtriert, war aber nicht ganz klar. Es ist sicher, daß die sehr hohe Viskosität dieser Lösungen teilweise von den feinen, aufgequollenen und nicht ganz vollständig aufgelösten Kaseinteilchen bedingt ist. Die Lösungen der Tabellen 2 und 4 wurden durch gewöhnliche Papierfilter filtriert und waren ganz klar. Die Konzentration dieser Lösungen wurde nachher durch Eindampfen, Trocknen und Wägen bestimmt.

Wie groß der Einfluß des grobdispersen Anteils auf die Viskosität ist, ist aus der Tabelle 5 zu ersehen.

Tabelle 5.

Kasein getrocknet 2 Stunden bei 125°. 2,5 g gelöst in 100 cm³ 0,1*n* NaOH.

Durch ein grobes Glasfilter filtrierte trübe Lösung		Klare Lösung (durch Papierfilter filtriert)	
<i>c</i> g/Liter	η_{sp}/c	<i>c</i> g/Liter	η_{sp}/c
25	0,1905	22	0,0630
12,5	0,1870	11	0,0686
6,25	0,2145	5,5	0,0752
3,125	0,1747	2,75	0,0874
1,560	0,2046	1,375	0,0910
0,780	0,1783	0,687	0,0930

Die verdünnteren Lösungen wurden hier, ebenso wie im Falle der in den Tabellen 2 und 4 angegebenen Lösungen, aus den konzentrierteren durch Verdünnen mit Wasser hergestellt. Die Lösungen waren 2 Tage alt.

Besprechung der Ergebnisse.

Aus dem Versuchsmaterial ist zu ersehen, daß 1. das erhitzte Kasein schwerer löslich ist, als das native, 2., daß die Lösungen des erhitzten Kaseins zäher sind, als die Lösungen des nativen. 3. Die große Zähigkeit der Lösungen ist zum Teil durch den grobdispersen Anteil bestimmt. Wird dieser Anteil abfiltriert, so fällt die Zähigkeit stark ab. 4. Ein weiteres Abfallen der Viskosität ist mit der Zeit zu beobachten. Die Änderungen der Viskosität sind fast ebenso groß wie im Falle des Desaminokaseins (a. a. O. 1). Bekanntlich haben die Lösungen des Desaminokaseins etwa 10 bis 20mal höhere spezifische Viskosität als die Lösungen

^{2a)} Vergl. Wo. Pauli u. L. Hoffmann, Kolloid-Beih. 42, 34 (1935).

des Kaseins, wobei die Viskosität des Desaminokaseins sich mit der Zeit erniedrigt. Es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die hohe Viskosität des Desaminokaseins hauptsächlich von der Teilchenform abhängt, d. h. daß die korpuskularen Kaseinmoleküle bei der Desaminierung in linearkolloide Teilchen umgewandelt wurden. Die chemischen Eigenschaften dagegen haben keinen großen Einfluß auf die Viskosität.

Die vorliegenden Ergebnisse sind mit diesen Schlußfolgerungen in vollem Einklang. Bei der Erhitzung werden die korpuskularen Kaseinmoleküle aufgelockert und in linearmakromolekulare

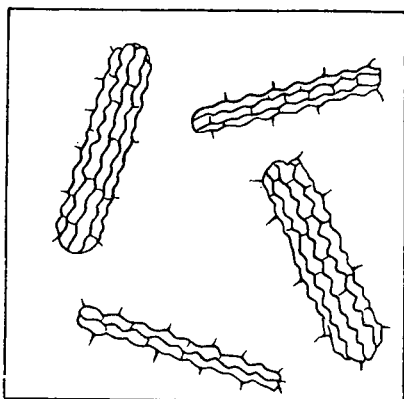


Abb. 1. Lösung des nativen Kaseins.

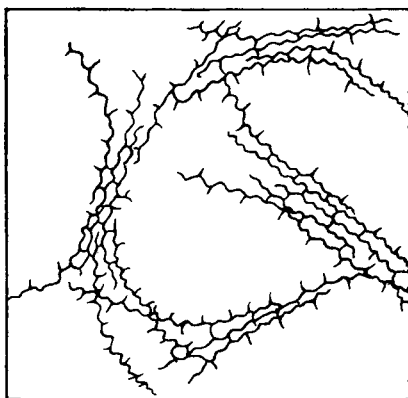


Abb. 2. Strukturierte Lösung des denaturierten Kaseins.

Gebilde verwandelt. Die Kohäsion zwischen den Peptidketten wächst, da die Möglichkeit des Zusammentretens einzelner Kettenteile durch die Auflockerung und Entrollung größer wird. Die Löslichkeit wird dabei geringer. Das Kettengerüst quillt und geht in Form kleiner gallertiger Teilchen in Lösung. Diese „ausgefranst“ Teilchen haften sich aneinander, wodurch die Lösung strukturiert wird.³⁾ Mit der Zeit erfolgt mehr und mehr vollständige Auflösung der gallertigen Teilchen, wobei die inneren Strukturen allmählich aufgehoben werden. Dabei vermindert sich die Viskosität.

Bemerkenswert sind noch zwei Fragen: 1. Wie groß sind die Teilchen des denaturierten Kaseins? 2. warum erniedrigen sich die Viskositätszahlen (η_{sp}/c) mit der Konzentration (im Falle homogener Lösungen des denaturierten Kaseins, Tab. 2, 4 und 5)?

³⁾ Vergl. H. Staudinger, Z. physik. Chem. (A) **153**, 391 (1931), sowie Die hochmol. organ. Verbindungen S. 131, Verlag J. Springer, 1932.

Es wurde versucht, die erste Frage mit Hilfe der Fällungstitration zu beantworten.⁴⁾ Verschiedene Lösungen des denaturierten und nativen Kaseins wurden durch Azeton titriert, aber keine deutlichen Unterschiede festgestellt. (Diese Versuchsreihen sind hier nicht angeführt.) Man kann also schließen, daß die Molekülgröße des denaturierten Kaseins von derjenigen des nativen sich nur wenig unterscheidet. Da die Lösungen des nativen Kaseins polymolekular sind,⁵⁾ ist es sehr wahrscheinlich, daß diejenigen des denaturierten Kaseins auch Teilchen sehr verschiedener Größe enthalten.

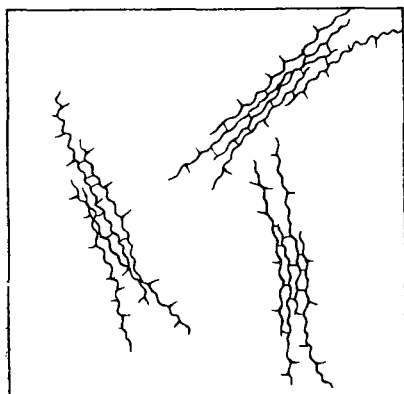


Abb. 3. Konzentrierte, alte Lösung des denaturierten Kaseins.

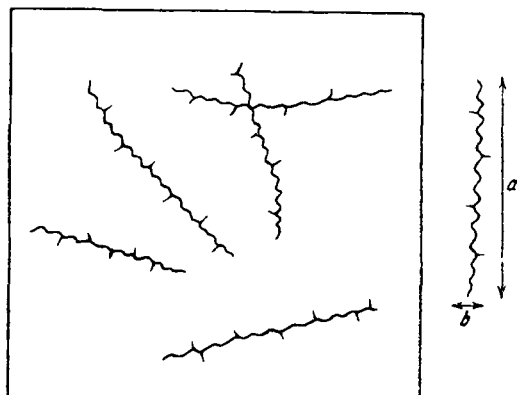


Abb. 4. Verdünnte Lösung des denaturierten Kaseins. Neben an ein einzelnes Kettenbündel mit Seitenketten des Aminosäurereste.

Bei den strukturierten Lösungen des denaturierten Kaseins sind die Viskositätszahlen (η_{sp}/c) groß und erhöhen sich meistens mit der Konzentration. Es ist selbstverständlich, daß die Möglichkeiten der Strukturierung mit wachsender Konzentration immer günstiger werden. Im Falle homogener Lösungen, in denen keine sichtbaren gallertigen Teilchen mehr vorhanden sind, erniedrigen sich dagegen die η_{sp}/c -Werte mit der Konzentration. Diese Tatsache ist am einfachsten als Folge der Aggregationseffekte zu erklären.^{5a)} Die Teilchen des denaturierten Kaseins sind stark

⁴⁾ H. Staudinger u. W. Heuer, Z. physik. Chem. (A) **171**, 139 (1934); G. V. Schulz, Z. physik. Chem. **179**, 312 (1937); G. V. Schulz u. B. Jirgensons, Z. physik. Chem. (B) **46**, 105 (1940); B. Jirgensons, J. prakt. Chem. **161**, 30 (1942).

⁵⁾ T. Svedberg, Kolloid-Z. **51**, 10 (1930); T. Svedberg, L. M. Carpenter u. D. C. Carpenter, J. Amer. Chem. Soc. **52**, 241, 701 (1930); D. C. Carpenter, J. Amer. Chem. Soc. **53**, 1812 (1931).

^{5a)} Vergl. S. P. L. Sørensen, Compt. rend. trav. labor. Carlsberg **15** (1923); J. Amer. Chem. Soc. **47**, 457 (1925).

langgestreckt. Im Falle großer Konzentration sind die Bedingungen zur Aggregatbildung günstiger als im Falle kleiner c . Dabei ist es sehr wahrscheinlich, daß die Teilchen parallel der Längsachse sich zusammenlagern, wobei das Achsenverhältnis (bei gleichem Gesamtvolumen) kleiner wird.⁶⁾ Bei der Verdünnung dagegen erfolgt Desaggregation, mit entsprechender Zunahme der η_{sp}/c -Werte.

Die Schlußfolgerungen sind in den Abbildungen schematisch dargestellt.

1. — Lösung des nativen Kaseins. Die längliche Teilchen bestehen aus vielen gekrümmten Peptidketten, bzw. Kettenhändeln mit Seitengruppen. Die Lösung ist polydispers.

2. — Strukturierte Lösung des denaturierten Kaseins.

3. — Konzentrierte, alte Lösung des denaturierten Kaseins. Einzelne Peptidketten oder Kettenbündel in relativ kompakte Mizellen aggregiert.

4. — Verdünnte Lösung des denaturierten Kaseins. Das Achsenverhältnis a/b und die η_{sp}/c -Werte größer, als in Abb. 3.

Zusammenfassung.

Kasein (nach Hammarsten) wurde bei verschiedenen Temperaturen erhitzt. Die Löslichkeit der denaturierten Kaseine in verschiedenen Lösungsmitteln wurde qualitativ bestimmt. Die Viskosität von Lösungen der hitzedenaturierten Kaseine wurde gemessen. Es wurde festgestellt, daß die Lösungen des denaturierten Kaseins zäher sind, als die Lösungen des nativen Kaseins. Die Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität wurde bestimmt. Es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß bei der Hitzedenaturierung, ebenso wie bei der Desaminierung, die korpuskularen Kaseinmoleküle aufgelockert und in faserige Teilchen verwandelt werden.

⁶⁾ Vergl. H. Nitschmann u. H. Guggisberg, *Helv. Chim. Acta* **24**, 434 (1941); G. Ettisch u. G. V. Schulz, *Biochem. Z.* **239**, 48 (1931); M. L. Anson u. A. E. Mirsky, *J. physik. Chem.* **35**, 185 (1931); W. J. Loughlin u. W. C. M. Lewis, *Biochem. Journ.* **26**, 476 (1932); A. Polson, *Kolloid-Z.* **88**, 51 (1939); H. Neurath, *J. Amer. Chem. Soc.* **61**, 1841 (1939); K. O. Pedersen, *Biochem. Journ.* **30**, 948 (1936).