

Über die Aminosäurezusammensetzung von trypsinresistenten Phosphopeptonen aus β -Casein

Von

M. Pantlitschko und E. Gründig

Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 23. Mai 1958)

Es wird die Darstellung des Ba-Salzes eines durch erschöpfende tryptische Verdauung aus reinem β -Casein erhaltenen Phosphopeptons beschrieben. Die Aminosäureanalyse ergab: Asp₃Thr₁Ser₃Glu₈Val₁Leu₁Ileu₂Ala₁Meth₁. Außerdem sind 3 Moleküle H₃PO₄ gebunden, deren Hydrolysenkonstante zu $0,82 \cdot 10^{-3}$ bestimmt wurde. Weiters konnte nachgewiesen werden, daß pro Molekül Pepton 1 Atom Fe in komplex gebundener Form vorliegt. Das Molekulargewicht wurde zu 3130 berechnet.

Die nach dem Vorschlag von *Rimington* und *Kay*¹ durch Trypsin nicht weiter angreifbaren, phosphorhaltigen Abbauprodukte des Caseins („Phosphopeptone“) verdienen u. E. besondere Aufmerksamkeit, da sie dem kindlichen Organismus die für den Aufbau wichtigen Elemente Ca, P und, wie wir sehen werden, auch Fe in besonders leicht aufnehmbarer Form zuführen. *O. Mellander*² hat gezeigt, daß die Ca-Salze der Phosphopeptone sehr leicht in Wasser löslich sind und das Ca nicht in ionisierter Form enthalten.

In einer vorangegangenen Arbeit³ haben wir aus reinem α -Casein ein Phosphopepton dargestellt und auf Grund verschiedenster Analyseergebnisse das mutmaßliche MG berechnet. Es lag auf der Hand, daß Phosphopeptone der einzelnen Caseinfractionen Unterschiede in der Zusammensetzung aufweisen. Wir haben deshalb Phosphopeptone aus reinem β -Ca-

¹ *C. Rimington* und *H. D. Kay*, *Biochem. J.* **20**, 777 (1926).

² *O. Mellander*, *Upsala Läkarefören. Förhandl.* **52**, 107 (1947).

³ *M. Pantlitschko* und *E. Gründig*, *Mh. Chem.* **89**, 274 (1958).

sein dargestellt und bringen in dieser Arbeit die auf Grund von papier- und säulenchromatographischen Analysen ermittelte Zusammensetzung. In einer späteren Arbeit werden wir auch über die Zusammensetzung des Phosphopeptons des γ -Caseins berichten.

Methodisches

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir Casein nach *Hammarsten*. Zur Isolierung von reinem β -Casein ist es vorteilhaft, aus dem Gemisch der einzelnen Komponenten zuerst das γ -Casein zu entfernen, da eine nachträgliche Trennung von β - und γ -Casein nur unter großen Schwierigkeiten möglich ist. Wir extrahierten das Ausgangsmaterial 4—6mal mit etwa 80° warmem, 60%igem Alkohol, bis die Hauptmenge des γ -Caseins entfernt war, und trockneten das verbliebene Gemisch von α - und β -Casein. Zur Gewinnung des reinen β -Caseins bewährte sich am besten die Methode von *Hipp* und Mitarb.⁴, die auf der verschiedenen Löslichkeit der Caseinfraktionen in Harnstoff-Wassermischungen bestimmter Konzentration beruht. Die Einheitlichkeit des isolierten β -Caseins wurde mit dem Mikroelektrophoreseapparat nach *Antweiler* überprüft (25 mA, 45 V, 20 Min.).

Die Darstellung des Ba-Salzes des Phosphopeptons erfolgte durch erschöpfenden Abbau mit handelsüblichem Trypsin bei 37° C ohne vorangegangene Pepsinverdauung. Die Isolierung und Reinigung als Bariumsalz haben wir³ ausführlich bei der Darstellung des Peptons aus dem α -Casein beschrieben.

Das Bariumsalz ist ein leicht gelb gefärbtes hygroskopisches Pulver, das sich in Wasser mit gelber Farbe löst.

Folgende Analysen wurden durchgeführt:

1. Prüfung auf Einheitlichkeit im elektrischen Feld (Ionenstärke 0,2, pH = 7,2, Phosphatpuffer 0,02 m, NaCl 0,18 m; Mikroelektrophoreseapparat nach *Antweiler*).

2. Die Analyse des nach Glühen bei 1000° bis zur Gewichtskonstanz erhaltenen Rückstandes ergab die Anwesenheit von Bariumpyrophosphat und Eisen(III)oxyd.

3. Stickstoffbestimmungen wurden nach *Kjeldahl* und nach *Dumas* durchgeführt.

4. Der Gesamtphosphor wurde nach *Lohmann* und *Jendrassik*⁵, anorganisches Phosphat bzw. die bei der Hydrolyse mit NaOH in Freiheit gesetzte Phosphorsäure nach *Lowry* und *Lopez*⁶ bestimmt.

⁴ *N. J. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer* und *T. L. MacMeekin*, *J. Dairy Sci.* **35**, 272 (1952).

⁵ *K. Lohmann* und *L. Jendrassik*, *Biochem. Z.* **178**, 419 (1926).

⁶ *O. H. Lowry* und *J. A. Lopez*, *J. Biol. Chem.* **162**, 421 (1946).

5. Der Eisengehalt wurde nach *C. B. Laurell*⁷ mit Hilfe der Farb-reaktion mit o-Phenanthrolin ermittelt.

Für die im folgenden beschriebenen Analysen wurde die über P_2O_5 getrocknete Substanz in zugeschmolzenem Glasröhrchen 16 Stdn. bei $110^\circ C$ mit 6 n HCl erhitzt, nachdem die Luft durch N_2 verdrängt worden war. Das Hydrolysat wurde zur Trockene verdampft und der in Wasser unlösliche Rückstand in 0,1 n HCl aufgenommen. Diese Lösung diente zu folgenden Bestimmungen:

6. Aminosäurenstickstoff nach der Carboxyl-C-Methode nach *van Slyke* und Mitarb.⁸

7. Amidstickstoff nach *Conway*⁹.

8. Qualitativer Nachweis der vorhandenen Aminosäuren nach *Fischer* und *Dörfel*¹⁰, mit gepufferten Verteilungsmedien nach *McFarren*¹¹. Für den Nachweis des Methionins neben Valin, Leucin und Isoleucin verwendeten wir das Lösungsmittelgemisch nach *Boissonas*¹².

9. Quantitative Aminosäurezusammensetzung nach *Moore* und *Stein*¹³ an Ionenaustauschersäulen Dowex 50-X 8. Die quantitative Bestimmung der eluierten Aminosäuren führten wir in derselben Weise durch, wie wir sie bei der Analyse des Peptons aus α -Casein angewendet haben³.

Ergebnisse

Das zum erschöpfenden tryptischen Abbau verwendete β -Casein aus Kuhmilch zeigte folgende Analysenwerte:

$$P = 0,56\%, N = 15,28\%, N:P = 60,4:1$$

$$(\text{Lit.}^{14}: P = 0,55\%; N = 15,39)$$

Die Bestimmung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit ergab den Wert von $u = 2,91 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Lit.¹⁴: $3,0 \cdot 10^{-5}$) bei folgenden Bedingungen: $4^\circ C$, $\mu = 0,2$, $pH = 7,2$.

Wie man aus der nachstehenden Abb. 1 entnehmen kann, ist das β -Casein elektrophoretisch einheitlich, jedoch konnten wir ebenso wie *Sullivan* und Mitarb.¹⁵ feststellen, daß bei der Untersuchung in der Ultra-

⁷ *C. B. Laurell*, Acta physiol. Scand. **14**, Suppl. 46 (1947).

⁸ *D. D. van Slyke*, *R. T. Dillon*, *D. A. MacFadyen* und *P. Hamilton*, J. biol. Chem. **141**, 627 (1941).

⁹ *E. J. Conway* und *E. O'Malley*, Biochem. J. **36**, 655 (1942).

¹⁰ *F. G. Fischer* und *H. Dörfel*, Biochem. Z. **324**, 544 (1953).

¹¹ *E. F. McFarren* und *J. A. Mills*, Anal. Chem. **24**, 650 (1952).

¹² *F. A. Boissonas*, Helv. Chim. Acta **33**, 1966 (1950).

¹³ *S. Moore* und *W. H. Stein*, J. biol. Chem. **192**, 663 (1951).

¹⁴ *R. C. Warner*, J. Amer. Chem. Soc. **66**, 1725 (1944).

¹⁵ *R. A. Sullivan*, *M. M. Fitzpatrick*, *E. K. Stanton*, *R. Annino*, *G. Kissel* und *F. Palermi*, Arch. Biochem. Biophys. **55**, 455 (1953).

zentrifuge unter den gleichen Bedingungen 2 Fraktionen nachweisbar sind (siehe Abb. 2), wobei der Hauptanteil eine $S_{20} = 8,13 \cdot 10^{-13}$ und

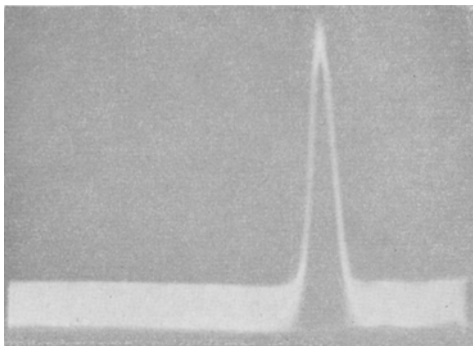


Abb. 1. Descend. patterns, β -Casein; Phosphatpuffer pH = 7,2, Ionenstärke 0,2

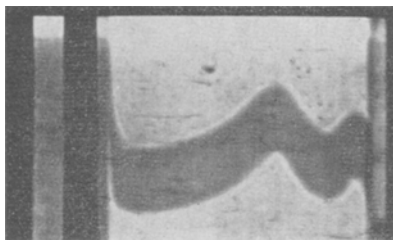


Abb. 2. Sedimentationskurve von β -Casein, Phosphatpuffer pH = 7,2, Ionenstärke 0,2, 100 Min., 56 600 g

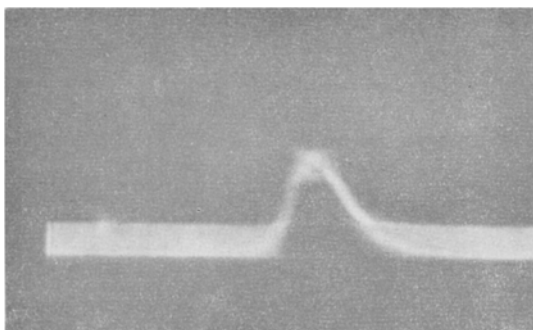


Abb. 3. Descend. patterns, Pepton aus β -Casein, Phosphatpuffer pH = 7,2, Ionenstärke 0,2

die zu etwa 20% vorliegende niedrig molekulare Fraktion ein $S_{20} = 1,43 \cdot 10^{-13}$ aufweist. Sullivan und Mitarb.¹⁵ geben für die Hauptkomponente in Phosphatpuffer (pH = 6,96), $\mu = 0,2$, die Werte für $S_{20} = 9,17 \cdot 10^{-13}$ und die Nebenkompente $S_{20} = 1,36 \cdot 10^{-13}$ an. Ob es sich dabei um reversible Dissoziationsstufen handelt, läßt sich nicht mit

Sicherheit behaupten. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß das β -Casein etwa 0,5% Fe in komplex gebundener Form enthält, während die α - und γ -Caseinfraktionen nahezu eisenfrei sind, jedenfalls nur Werte um 0,01% aufwiesen. Wie orientierende Versuche zeigten, ist β -Casein imstande, wesentlich

mehr Eisen komplex zu binden als die beiden anderen Komponenten. Das soll den Gegenstand einer eigenen Untersuchung bilden.

Aus dem oben beschriebenen β -Casein stellten wir drei verschiedene Präparationen des Ba-Salzes des Phosphopeptons her, die in ihrer quali-

tativen und quantitativen Zusammensetzung identisch waren. Abb. 3 zeigt, daß das isolierte Ba-Salz des Phosphopeptons frei von höher mole-

kularen Anteilen ist. Niedriger molekulare Bestandteile sind u. E. mit dieser Methode wegen der hohen Diffusionsgeschwindigkeit nicht nachweisbar.

In Tabelle 1 sind die Analysenergebnisse (Mittelwerte) zusammengefaßt und mit den Analysenwerten des Trypsin- α -Peptons verglichen.

Tabelle 1

Pepton aus	Glührückstand %	Phosphor			Ba aus Glührückstand	Gesamtstickstoff	Aminostickstoff	Amidstickstoff	Schwefel	Acetyl	Fe	N : P
		anorg. %	Gesamt %	aus Glührückstand								
α -Casein	26,75	—	3,62	3,71	16,40	9,21	8,18	0,99	0,96	2,52	—	5,5 : 1
β -Casein	24,4	—	2,98	2,93	13,40	10,86	9,30	1,36	1,05	—	1,86	8,0 : 1

Man kann daraus entnehmen, daß die Bariumsalze des Phosphopeptons frei von anorganischer Verunreinigung sind. Wir können kein anorganisches Phosphat nachweisen und der aus dem Rückstand (abzüglich Fe_2O_3) berechnete Phosphorgehalt stimmt mit dem Gesamtphosphor nach nasser Veraschung überein. Weiters ist der hohe Eisengehalt und das Atomverhältnis N:P beachtenswert.

Papierchromatographisch konnten mit den im Methodischen Teil angegebenen Steigmitteln folgende 9 Aminosäuren nachgewiesen werden:

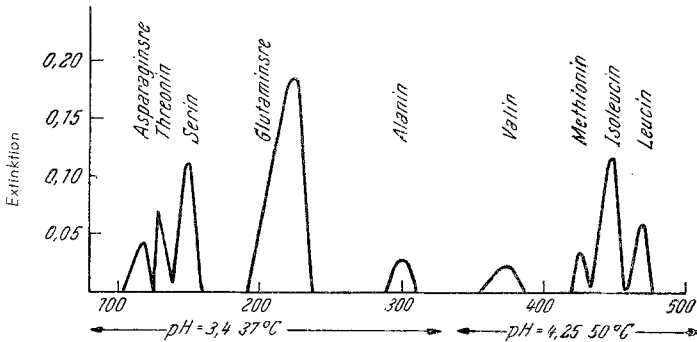


Abb. 4. Extinktion pro 50 μ l Eluat

Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin, Serin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Methionin. Über die quantitativen Verhältnisse der Aminosäuren gab uns die Säulenchromatographie nach Moore und Stein¹³ Aufschluß. Abb. 4 zeigt ein Austauschchromatogramm eines bei 110° in 6 n HCl hydrolysierten Phosphopeptons aus β -Casein.

Daraus berechnen sich die in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnisse. Auch hier konnten wir eine sehr gute Übereinstimmung des nach⁸ be-

stimmten Aminosäure-N im Totalhydrolysat mit dem aus den getrennten Aminosäuren berechneten N-Gehalt feststellen. Wir ziehen daraus den Schluß, daß es bei den von uns gewählten Hydrolysenbedingungen nur zu einer geringfügigen Zerstörung von Aminosäuren kommt. Wir entnehmen daraus aber auch, da wir bei verschiedenen Präparationen nur geringfügige Abweichungen von den ganzzahligen Verhältnissen der Aminosäuren feststellen konnten, daß unsere dargestellten Peptone frei von niedrig molekularen Verunreinigungen sind.

Tabelle 2

Aminosäure	$\times 10^{-6}$ Mol	γ Amino-N	Mol Aminosäure pro Mol Pepton
Asparaginsäure	4,68	65,5	3
Glutaminsäure	12,55	175,8	8
Threonin	1,57	22,0	1
Serin	4,84	67,8	3
Alanin	1,53	21,4	1
Valin	1,59	22,2	1
Isoleucin	2,98	41,7	2
Leucin	1,54	21,6	1
Methionin	1,57	22,0	1

Die Bestimmung des „Amid-N“ nach Conway ergab vor und nach der Hydrolyse den gleichen Wert von 1,36%, so daß die Annahme gerechtfertigt erscheint, daß der Amid-N tatsächlich präformiert im Pepton vorliegt und nicht artifiziell durch die Hydrolyse entstanden ist. Die Gesamtstickstoffbestimmungen nach *Kjeldahl* und nach *Dumas* ergaben 10,86%; die Summe des nach⁸ und⁹ bestimmten N beträgt 10,76%, so daß auch hier die üblichen Fehlerbreiten nicht überschritten werden.

Der Eisengehalt des Phosphopeptons aus β -Casein (Phosphopepton aus α -Casein ist eisenfrei!) ist überraschend hoch und ergibt, daß gerade 1 Atom Fe einem Mol Peptid entspricht. Es liegt in der dreiwertigen Form komplex gebunden vor. Das im Pepton gebundene Fe gibt keine Rhodanidreaktion, kann aber in alkalischer Lösung mit S-Ionen als Sulfid gefällt werden. *O. Mellander*¹⁶ hat bereits 1955 darauf hingewiesen, daß organische Phosphorverbindungen aus Phosphorproteinen Metallionen chelatartig binden können. *F. Österberg*¹⁷ hat die Metallbindungsfähigkeit von

¹⁶ *O. Mellander*, *Nutrit. Rev.* **13**, 191 (1955).

¹⁷ *R. Österberg*, *Nature* [London] **179**, 476 (1957).

Phosphoserin untersucht und kommt zu dem Schluß, daß diese Komponente für die Chelatbindung von Metallionen an Phosphopeptonen maßgeblich ist. Auf Grund der von *Bielig*¹⁸ referierten Arbeiten über die Bindung des Fe in peptidartigen Verbindungen kann man annehmen, daß auch in der oben beschriebenen Verbindung das Fe als FeO(OH) vorliegt.

Aus den vorliegenden Analysenergebnissen können wir unter der Voraussetzung, daß das Pepton aus 21 Aminosäuren, 3 Amidgruppen, 3 Phosphorsäuregruppen, 3 Bariumatomen und einer FeO(OH)-Gruppe besteht, das Molekulargewicht zu 3130 berechnen. In der Tabelle 3 bringen wir eine Gegenüberstellung der unter obiger Annahme berechneten und der gefundenen Analysendaten.

Tabelle 3

%	Gesamt-N	Amino-N	Amid-N	Barium	Phosphor	Eisen	Schwefel
gefunden	10,86	9,30	1,36	13,40	2,96	1,86	1,05
berechnet	10,74	9,40	1,34	13,26	2,98	1,79	1,02

Bei der Niederschrift dieser Arbeit erhielten wir Kenntnis von den Untersuchungen von *Peterson* und Mitarb.¹⁹, die sich ebenfalls mit der Analyse eines Phosphopeptons, das durch Verdauung von reinem β -Casein mit kristallisiertem Trypsin dargestellt wurde, befassen. Die oben genannten Autoren kommen zu etwas anderen Ergebnissen als wir. Übereinstimmend mit ihnen finden aber auch wir keine aromatischen Aminosäuren. Auf Grund der Bestimmung der Hydrolysenkurve, die nach der Gleichung einer monomolekularen Reaktion verläuft, müssen wir annehmen, daß alle in dem Pepton vorkommenden Phosphorsäurereste gleichartig gebunden sind. Die Versuche von *Perlman*²⁰ lassen sich aber durch die Tatsache, daß die Hydrolysenkonstante für die Abspaltung des Phosphors in 0,02 n NaOH bei 37° für α -Phosphopepton mit $38 \cdot 10^3$ wesentlich größer ist als für das β -Phosphopepton mit $0,83 \cdot 10^3$, erklären. Wir konnten in keinem unserer Papierchromatogramme Anhaltspunkte dafür finden, daß Prolin, Glykokoll und Arginin als Bestandteile unseres Peptons vorhanden sind. Dagegen konnten wir die Anwesenheit von Schwefel nach *Carius* und von Methionin sowohl papier- als auch säulenchromatographisch nachweisen. Daß die oben erwähnten Autoren die Anwesenheit von Fe nicht erwähnen, läßt sich wahrscheinlich so erklären, daß sie ihr

¹⁸ *H. J. Bielg*, *Angew. Chem.* **67**, 731 (1955).

¹⁹ *R. F. Peterson*, *L. W. Nauman* und *T. L. McMeekin*, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 95 (1958).

²⁰ *G. E. Perlman*, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 3191 (1952).

Pepton durch saure Säulenchromatographie von Barium und damit auch von Fe befreien. Möglicherweise kann durch die lange Einwirkungsdauer des Trypsins eine Abspaltung des Arginins eintreten, so daß unsere Peptone frei von Arginin gefunden werden. Unsere Analysenergebnisse sprechen aber auch dafür, daß trotz der langen Einwirkungsdauer hoch molekulare, trypsinresistente Bruchstücke gebildet werden, die aus etwa 10 verschiedenen Aminosäuren bestehen können, wie durch *O. Mellander* und *Verdier*²¹ bereits nachgewiesen wurde. Damit befinden wir uns im Gegensatz zu *Peterson* und Mitarb., die annehmen, daß speziell durch kurzdauernde Einwirkung von kristallisiertem Trypsin solche höhermolekulare Peptide entstehen können. Es ist auch anzunehmen, daß bei der Prüfung auf Reinheit durch die Elektrophorese die okkludierten niedrigmolekularen Bruchstücke nicht erfaßbar sind.

²¹ *O. Mellander* und *C. H. Verdier*, Acta Soc. Med. Upsal. **57**, 218 (1952).