

Über den Abbau von α -Casein durch Pepsin

Von

E. Gründig und M. Pantlitschko

Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 28. September 1959)

Bei der peptischen Verdauung von elektrophoretisch einheitlichem α -Casein entsteht ein gegen weitere Pepsineinwirkung resistentes Polypeptid, das in Form seines Bariumsalzes leicht gewonnen werden kann. Die Aminosäureanalyse ergab: Asp₂Thr₂Ser₄Glu₅Leu₁Ileu₂Gly₁Ala₁Val₁Meth₂Pha₁. Mit diesem Peptid sind 4 Phosphorsäuren verestert, die in Form ihres Bariumsalzes vorliegen. Das Molekulargewicht dieser Verbindung beträgt 3479. Es wird ein Vergleich mit der Zusammensetzung eines Peptons, das durch tryptische Verdauung von α -Casein gewonnen wurde, gegeben.

In vorangegangenen Mitteilungen^{1, 2} haben wir über die Isolierung und Aminosäurezusammensetzung von trypsinresistenten Peptonen aus α - und β -Casein berichtet. Abgesehen von Arbeiten älterer Autoren³ liegen noch keine Untersuchungen über die Endprodukte der peptischen Verdauung reiner Caseinfractionen vor. *Damodaran* und *Ramachandran*⁴ berichten, daß bei Einwirkung von Pepsin auf unfraktioniertes Casein ein in Säure unlösliches Produkt, das sogenannte Paranuclein, entsteht, aus dem die erwähnten Autoren durch weiteren tryptischen Abbau ein Phosphopepton isolierten.

¹ M. Pantlitschko und E. Gründig, *Mh. Chem.* **89**, 274 (1958).

² M. Pantlitschko und E. Gründig, *Mh. Chem.* **89**, 489 (1958).

³ T. B. Robertson und H. C. Biddle, *J. Biol. Chem.* **9**, 295 (1911); **12**, 233 (1912); H. Rohonyi, *Biochem. Z.* **53**, 179 (1913); Y. Uwatoko, *Z. physiol. Chem.* **139**, 76 (1924); C. Rimington und H. D. Kay, *Biochem. J.* **20**, 777 (1926); H. Holter, K. Linderström-Lang und J. B. Funder, *Z. physiol. Chem.* **206**, 85 (1932).

⁴ M. Damodaran und B. V. Ramachandran, *Biochem. J.* **35**, 122 (1941).

Um die Frage zu klären, ob auch durch das Einwirken von Pepsin allein auf Caseinfraktionen einheitliche phosphorhaltige Polypeptide entstehen, unterwarfen wir reines α -Casein, das mit verd. HCl auf pH = 1,8 gebracht wurde, 6 Tage lang der peptischen Verdauung. Es konnte bei verschiedenen Versuchsansätzen niemals die Bildung eines in Säure unlöslichen Paranucleins festgestellt werden. Wurde jedoch elektrophoretisch einheitliches β -Casein der peptischen Verdauung unterworfen, so konnten etwa 20% der eingesetzten Caseinmenge als säureunlösliches „Paranuclein“ isoliert werden. Darüber berichten wir in einer späteren Publikation.

Methodisches

Reines α -Casein wurde nach *Hipp et al.*⁵ dargestellt und die Reinheit elektrophoretisch überprüft. Das Pulver suspendierten wir in Wasser und brachten durch Zugabe von verd. HCl das pH auf 1,8. Als Ferment benutzten wir handelsübliches Pepsin DAB 6 der Heilmittelwerke Wien. Die Verdauung erfolgte bei 37° durch 6 Tage hindurch unter Toluolschutz, wobei durch Rühren für eine gute Durchmischung gesorgt wurde. Der pH-Wert wurde am 1. Tag mehrmals kontrolliert und Abweichungen korrigiert. Später traten nur mehr geringfügige pH-Änderungen ein. Nach sechstägiger Verdauung stellten wir die Lösung für 24 Stdn. in eine Eiskammer, um eventuell schwer lösliche Peptide abzutrennen. Wie bereits erwähnt, konnten wir jedoch nie die von *Damodaran* und *Ramachandran*⁴ erwähnte Bildung eines Paranucleins feststellen. Geringfügige Trübungen wurden abzentrifugiert, die klare Lösung zur Abstumpfung der vorhandenen HCl mit einer gesätt. Lösung von Ba(OH)₂ versetzt und mit einem Bariumacetat-Essigsäurepuffer auf pH = 4 eingestellt. Es trat keine Ausfällung ein, erst auf Zusatz des doppelten Volumens 96proz. Alkohol erhielten wir eine massive Fällung der Bariumsalze der Phosphopeptone. Zur Befreiung von mitgefälltem anorganischem Phosphat wurde der Niederschlag nach dem Zentrifugieren in destill. Wasser gelöst, mit Ba(OH)₂ auf pH = 7,5 gebracht und das in geringer Menge anfallende Bariumphosphat abzentrifugiert. Die klare Lösung stellten wir durch Zugabe von verd. Essigsäure auf pH = 4,6 ein und schüttelten sie 10 Min. mit Kaolin (1 g auf 10 ccm Lösung). Nach dem Entfernen des Kaolins wurden durch Zugabe von 2 Vol. Alkohol die Bariumsalze der Phosphopeptone wieder gefällt und das erhaltene Produkt im Elektrophoreseapparat nach *Antweiler* (Phosphatpuffer pH = 7,2, $\mu = 0,1$) auf Einheitlichkeit geprüft. Aus den zunächst anfallenden zwei Komponenten kann durch wiederholtes Umfällen unter obigen Bedingungen eine elektrophoretisch einheitliche Substanz gewonnen werden.

Dieses Bariumsalz, das frei von anorganischen Verunreinigungen war, haben wir auf folgende Weise untersucht:

1. Prüfung auf Einheitlichkeit einer 1proz. Lösung im elektrischen Feld (Ionenstärke $\mu = 0,1$, pH 7,2, Phosphatpuffer 0,02 m, NaCl 0,18 m, Mikroelektrophorese nach *Antweiler*).

2. Analyse des nach Glühen bei 1000° bis zur Gewichtskonstanz erhaltenen Niederschlages ergab nur die Anwesenheit von Ba₂P₂O₇.

⁵ *N. J. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer und T. L. McMeekin, J. Dairy Sci.* **25**, 272 (1952).

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

4. Den Gesamtphosphor bestimmten wir nach *Lohmann* und *Jendrassik*⁶, während die Prüfung auf freies anorganisches Phosphat nach *Weil-Malherbe*⁷ bzw. *Lowry* und *Lopez*⁸ durchgeführt wurde.

Für die im folgenden beschriebenen Analysen wurde die Substanz in 6 n-HCl im zugeschmolzenen Röhrchen in Stickstoffatmosphäre bei 110° durch 16 Stdn. hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde zur Trockene verdampft und die HCl durch mehrmaliges Aufnehmen in Wasser und Abdampfen entfernt.

5. Der Aminosäurestickstoff wurde nach der Carboxyl-C-Methode nach *van Slyke* und Mitarb.⁹ ermittelt.

6. Den Amidstickstoff bestimmten wir vor und nach der Hydrolyse nach *Conway*¹⁰.

7. Der qualitative Nachweis der vorhandenen Aminosäuren wurde nach *Fischer* und *Dörffel*¹¹ mit gepufferten Verteilungsmedien nach *McFarren*¹² bzw. den Lösungsmittelgemischen nach *Boissonas*¹³ durchgeführt.

8. Die Trennung der Aminosäuren erreichten wir an Dowex 50 \times 8-Säulen nach der Methode von *Moore* und *Stein*¹⁴. Die quantitative Bestimmung der eluierten Aminosäuren führten wir wie früher beschrieben durch¹.

Ergebnisse

Das durch Pepsineinwirkung auf α -Casein erhaltene Peptongemisch wurde einer Vorfraktionierung unterzogen, indem wir die Bariumsalze mit Alkohol fällten. Abb. 1 zeigt, daß in dieser Fraktion zwei Peptone mit

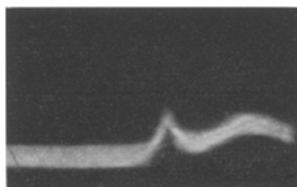


Abb. 1.

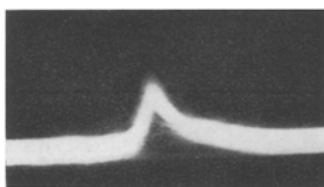


Abb. 2.

Abb. 1 und 2. Elektrophoresediagramm der ungereinigten (Abb. 1) bzw. gereinigten (Abb. 2) durch Alkoholfällung erhaltenen Phosphopeptide. (*Antweiler*, pH = 7.2; μ = 0,1, 7 Min.)

verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit vorhanden sind. Laut Abb. 2 haben wir durch mehrmaliges Umfällen des Bariumsalzes eine einheitliche Peptidfraktion isoliert, die phosphorhaltig war und durch eine große Diffusionsgeschwindigkeit charakterisiert ist.

⁶ *K. Lohmann* und *L. Jendrassik*, *Biochem. Z.* **178**, 419 (1926).

⁷ *H. Weil-Malherbe* und *R. H. Green*, *Biochem. J.* **49**, 286 (1952).

⁸ *O. H. Lowry* und *J. A. Lopez*, *J. Biol. Chem.* **162**, 412 (1946).

⁹ *D. D. van Slyke*, *R. T. Dillon*, *D. A. MacFadyen* und *P. Hamilton*, *J. Biol. Chem.* **141**, 726 (1941).

¹⁰ *E. J. Conway* und *E. O'Malley*, *Biochem. J.* **36**, 655 (1942).

¹¹ *F. G. Fischer* und *H. Dörffel*, *Biochem. Z.* **324**, 544 (1953).

¹² *E. F. McFarren* und *J. A. Mills*, *Anal. Chem.* **24**, 650 (1952).

¹³ *R. A. Boissonas*, *Helv. Chem. Acta* **33**, 1966 (1950).

¹⁴ *S. Moore* und *H. Stein*, *J. biol. Chem.* **192**, 633 (1951); **211**, 893 (1954).

In Tab. 1 bringen wir die Analysenergebnisse (Mittelwerte aus drei verschiedenen Präparationen). Zum Vergleich haben wir die Analysendaten des Peptons, das durch tryptische Verdauung aus reinem α -Casein erhalten wurde¹, in die Tabelle mit aufgenommen. Die Übereinstimmung

Tabelle 1. Analysenergebnisse der durch Pepsin- bzw. Trypsin- einwirkung erhaltenen Phosphopeptone (Bariumsalze)

| Pepton aus α -Casein durch | Glührückstand in % | Phosphor in % | | | Ba aus Glührückst. % | Stickstoff | | | S | N:P |
|-----------------------------------|--------------------|---------------|--------|-------------------|----------------------|------------|-------|------|------|--------|
| | | anorg. | Gesamt | aus Glührückstand | | Gesamt | Amino | Amid | | |
| Pepsineinwirkung | 25,64 | — | 3,56 | — | 15,25 | 11,00 | 9,16 | 2,12 | — | 6,94:1 |
| Trypsineinwirkung | 26,75 | — | 3,62 | 3,71 | 16,40 | 9,21 | 8,18 | 0,99 | 0,96 | 5,5:1 |

zwischen dem aus dem Glührückstand berechneten und den tatsächlich gefundenen Phosphorwerten sowie die Abwesenheit von anorganischem Phosphat führt uns zu der Annahme, daß das Bariumsalz des Peptons frei von anorganischer Verunreinigung ist. Mit Hilfe der Papierchromatographie konnten wir elf Aminosäuren nachweisen, die wir mit Hilfe der Säulenchromatographie nach *Moore* und *Stein* quantitativ bestimmten.

Tabelle 2. Auswertung des Austauschchromatogramm von Abb. 3 (Phenylalanin und Asparaginsäure $1,98 \cdot 10^{-6}$ Mol = 1)

| Aminosäure | 10^{-6} Mole Aminosäure bezogen auf Einwaage | Mol Aminosäure pro Mol Pepton |
|--------------------------|--|-------------------------------|
| Asparaginsäure | 3,95 | 2,00 |
| Glutaminsäure | 9,80 | 4,95 |
| Serin | 7,92 | 3,99 |
| Threonin | 3,58 | 1,82 |
| Glykokoll | 2,05 | 1,03 |
| Alanin | 1,87 | 0,95 |
| Valin | 3,64 | 1,84 |
| Leucin | 2,07 | 1,04 |
| Isoleucin | 3,92 | 1,98 |
| Phenylalanin | 1,98 | 1,00 |
| Methionin | 3,81 | 1,92 |
| | | 22,52 |

In Tab. 2 haben wir die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Abb. 3 zusammengestellt. Als Kriterium der quantitativen Elution diente uns der Vergleich des Stickstoffwertes des Hydrolysates (Carboxyl-C-Methode, *van Slyke*) mit dem aus den eluierten Aminosäuren berechneten. Wir fanden eine gute Übereinstimmung. Die Amidstickstoffbe-

stimmung lieferte vor und nach der Hydrolyse den gleichen Wert von 2,12%. Wir können also annehmen, daß von den im Molekül vorhandenen

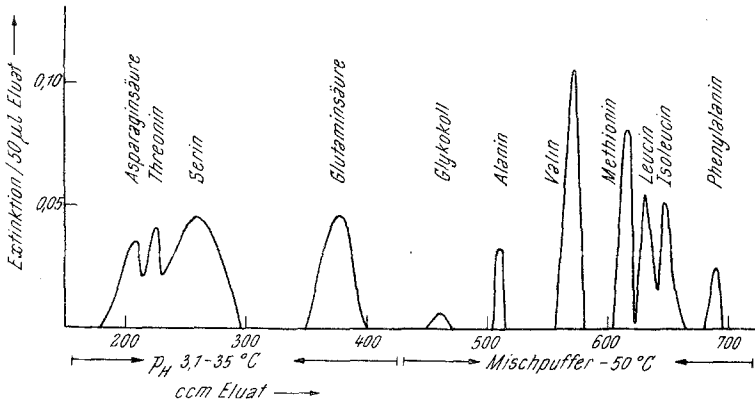


Abb. 3. Extinktion pro 50 µl Eluat

Tabelle 3. Vergleich der berechneten und gefundenen Analysendaten

| | Glührückstand | P | Ba | Gesamt-N | Amid-N | Amino-N | N:P |
|--------|---------------|------|-------|----------|--------|---------|--------|
| Ber. % | 25,00 | 3,51 | 15,56 | 11,25 | 2,02 | 9,27 | 7,00:1 |
| Gef. % | 25,64 | 3,56 | 15,25 | 11,00 | 2,12 | 9,16 | 6,94:1 |

Tabelle 4. Anzahl der in den Phosphopeptonen gefundenen Aminosäuren

A = Trypsinresistentes Pepton, B = Pepsinresistentes Pepton

| | A | B |
|--------------------------------|---|---|
| Asparaginsäure | 1 | 2 |
| Glutaminsäure | 6 | 5 |
| Serin | 4 | 4 |
| Threonin | 1 | 2 |
| Glykokoll | 1 | 1 |
| Alanin | 2 | 1 |
| Valin | 2 | 2 |
| Leucin | 1 | 1 |
| Isoleucin | 1 | 2 |
| Methionin | 1 | 2 |
| Phenylalanin | — | 1 |
| Acetyl-glucoamin | 2 | — |
| Phosphorsäure | 4 | 4 |
| Barium | 4 | 4 |
| Amid-NH ₂ | — | 5 |

7 Dicarbonsäuren 5 in Amidform vorliegen. Das Molekulargewicht berechnet sich auf Grund der obigen Angaben zu 3479.

Tab. 3 gibt einen Vergleich der experimentell gefundenen mit den unter Zugrundelegung obigen Molekulargewichtes berechneten Werten. Sie zeigen recht gute Übereinstimmung.

In Tab. 4 haben wir die Zusammensetzung der Bariumsalze der Peptone, die durch tryptischen bzw. peptischen Abbau entstehen, nebeneinandergestellt. Die Molekulargewichte differieren nur geringfügig. Die Anzahl der esterartig verknüpften Phosphorsäuren ist in beiden Molekülen gleich. Das wesentlichste Unterscheidungsmerkmal des durch Pepsinwirkung auf α -Casein erhaltenen Peptons vom trypsinresistenten Produkt ist das Fehlen des Acetylglucosamins, dagegen konnten wir Phenylalanin nachweisen. Basische Aminosäuren wurden auch in diesem Pepton nicht aufgefunden¹⁵.

¹⁵ R. F. Petersen, L. W. Naumann und T. L. McMeekin, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 95 (1958).