

KURZE MITTEILUNG

Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht

Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch

XIV¹ Aminosäurezusammensetzung des aus *k*-Casein durch Lab in Freiheit gesetzten Glyko-Makropeptids

Die Aminosäurezusammensetzung des Glyko-Makropeptides, das bei der Einwirkung von Lab auf Lösungen von Kuhmilchcasein in Freiheit gesetzt wird², ist kürzlich von JOLLÈS und ALAIS³ und fast gleichzeitig von NITSCHMANN und HENZI¹ ermittelt worden. Die Werte dieser beiden Arbeitsgruppen für die elf am Aufbau beteiligten Aminosäuren stimmten recht gut überein. JOLLÈS und ALAIS konnten auch zeigen, daß ein Peptidpräparat, erhalten aus α -Casein, dieselben Analysenwerte ergibt wie Präparate, die man aus Gesamt-Casein bekommt. Nun ist seit längerer Zeit bekannt, daß nach älteren Methoden gewonnenes α -Casein nicht einheitlich ist. Es läßt sich aus ihm eine Subfraktion isolieren, *k*-Casein nach WAUGH⁴ oder α_2 -Casein nach McMEEKIN⁵, die das eigentliche Substrat für die Primärreaktion der Labgerinnung der Milch zu sein scheint und die somit das Schutzkolloid darstellt, das für die Stabilisierung der kolloiden Dispersion des Calciumcaseinates verantwortlich ist. Verschiedene Autoren haben auch festgestellt, daß *k*-Casein unter der Einwirkung von Lab einen besonders hohen Prozentsatz an in Trichloressigsäure löslichem NPN (Nicht-Protein-N) liefert. Da das Glyko-Makropeptid diesen Löslichkeitskriterien entspricht und auf Grund der Mengenverhältnisse der Spaltprodukte (siehe hierzu auch WAKE⁶), konnte angenommen werden, daß es sich beim NPN aus *k*-Casein um eben dieses Peptid handelt, das somit ein Abbauprodukt dieser Caseinfraktion darstellen würde. Für diese Annahme haben wir nun noch den direkten Beweis erbracht, indem wir gefunden haben, daß das Makropeptid, welches aus der gelabten Lösung von *k*-Casein isoliert werden kann,

identisch mit demjenigen ist, das man aus Lösungen von α -Casein (Komplex von $\alpha_1 + \alpha_2$, bzw. $\alpha_s + k$) oder von Gesamt-Casein bekommt. Der Identitätsbeweis stützt sich vor allem auf die quantitative Aminosäurezusammensetzung.

Experimentelles

Das *k*-Casein wurde aus frischer Magermilch (Mischmilch) nach einer relativ einfachen Vorschrift von R. G. WAKE⁷ isoliert, die von der vom selben Autor früher publizierten Methode⁸ beträchtlich abweicht. Aus 5 l Milch wurden 4,5 g *k*-Casein erhalten. Das Präparat erwies sich als immunoelektrophoretisch einheitlich. Beim Entwickeln mit Anti- α -Casein-Antiserum (von Kaninchen**) erschien auch bei Variation der Konzentrationsverhältnisse nur eine einzige Präzipitationslinie, während das α -Casein[†], das auch zur Immunisierung verwendet worden war, mit demselben Antiserum 3 bis 4 Linien ergeben hatte¹⁰. Eine 1,5prozentige Lösung dieses *k*-Caseins als Na-Salz (pH 7,0) wurde bei Labzusatz zuerst trübe und gab dann eine Fällung. Der in 12% Trichloressigsäure lösliche N stieg während der Labung von 2% auf 10% (Differenz 8%), der bei pH 4,7 lösliche von 11% auf 31%.

Das Makropeptid wurde aus dem Trichloressigsäurefiltrat des gelabten *k*-Caseins nach der von NITSCHMANN und HENZI¹ angegebenen Methode (b) isoliert. Das trockene Präparat enthielt 11,2% N (Präparate aus Gesamt-Casein gaben Werte zwischen 10,8 und 12,9% und 0,50% P. Farbreaktionen auf Hexose, Hexosamin und Neuraminsäure fielen stark positiv aus.

Die Aminosäureanalyse wurde doppelt mit einem automatisch registrierenden Chromatographen nach SPACKMAN, STEIN und MOORE der Beckman Instruments, Inc. ausgeführt^{††}. Hydrolyse des Peptids: 24 Stunden bei 110° mit 6-n. HCl unter O₂-Ausschluß. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle zusammengestellt.

** Für die Überlassung des Antiserums danken wir Dr. G. MOCQUOT und J. GARNIER, Station Central de Microbiologie et de Recherches Laitiers, Jouy-en-Josa (S.-et-O., France).

† α -Casein, hergestellt nach der Harnstoffmethode von HIPPEL⁹. Es handelt sich dabei um den das *k*-Casein enthaltenden Komplex, der sich in der Elektrophorese meist einheitlich verhält.

†† Für die Ausführung danken wir Professor MAX BRENNER und Dr. ROLF WEBER, Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel.

⁷ R. G. WAKE, persönliche Mitteilung, September 1959. H. A. MCKENZIE und R. G. WAKE, An Improved Method for the Isolation of *k*-Casein, *Biochim. Biophysica Acta* (im Druck).

⁸ R. G. WAKE, *Austral. J. Biol. Sci.* 12 (1959) 538.

⁹ H. J. HIPPEL, M. L. GROVES, J. H. CUSTER und T. L. McMEEKIN, *J. Dairy Sci.* 35 (1952) 273.

¹⁰ J. GARNIER, XV. Internationaler Milchwirtschaftskongreß (London) 3 (1959) 1448. E. GUGLER, M. BEIN und G. VON MURALT, *Schweiz. Med. Wschr.* 89 (1959) 1172.

* Ständige Adresse: Dairy Research Section, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Melbourne, Australia.

¹ Nr. XIII dieser Serie: Hs. NITSCHMANN und R. HENZI, Untersuchung der bei der Labung in Freiheit gesetzten Peptide, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 1985.

² CH. ALAIS, XIV. Internationaler Milchwirtschaftskongreß (Rom) 2 (1956) 823. Hs. NITSCHMANN, H. WISSMANN und R. HENZI, *Chimia* 11 (1957) 76.

³ P. JOLLÈS und C. ALAIS, *Biochim. Biophysica Acta* 34 (1959) 565.

⁴ D. F. WAUGH und P. H. VON HIPPEL, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4576.

⁵ T. L. McMEEKIN, M. L. GROVES und H. J. HIPPEL, *Abstracts, Meeting of the American Chemical Society*, Miami 1957, S. 65 c.

⁶ R. G. WAKE, *Austral. J. Biol. Sci.* 12 (1959) 479.

Tabelle 1. Aminosäurezusammensetzung verschiedener Glyko-Makropeptidpräparate (die Werte haben keine Korrekturen für allfällige Hydrolyseverluste erfahren). a) Peptid aus *k*-Casein. b) Peptid aus Gesamt-Casein, Präparat GMP (a)1 von NITSCHMANN und HENZI¹. Früher bestimmte Werte für 24-Stunden-Hydrolyse. c) Peptid aus α -Casein. Mittelwerte der von JOLLÈS und Alais³ für ihre chromatographierten Präparate B_a und C_a angegebenen Zahlen (24-Stunden-Hydrolyse).

Aminosäure	Mikromole pro 10 mg Substanz	Gewichts-%, bezogen auf die Summe der Aminosäuren		
		a)	b)	c)
Lys	3,17 ± 0,06	6,65	6,4	7,0
Asp	4,33 ± 0,08	8,3	7,9	10,1
Thr	9,31 ± 0,15	15,9	16,3	15,1
Ser	5,02 ± 0,10	7,6	7,1	8,1
Glu	9,62 ± 0,15	20,2	20,1	18,2
Pro	7,62 ± 0,15	12,5	12,1	11,7
Gly	1,05 ± 0,02	1,13	1,02	0,95
Ala	4,86 ± 0,08	6,2	6,3	7,8
Val	5,12 ± 0,08	8,6	10,1	8,5
Ileu	5,65 ± 0,10	10,6	10,7	9,8
Leu	1,25 ± 0,02	2,35	2,05	2,6
Hist, Arg, Tyr, Phe } NH ₃	0,65 ± 0,02	—	—	—
	9,41 ± 0,15	—	—	—
Summe	67,06	100,03	100,07	99,85

Beim Vergleich der Zahlen mit denjenigen für Peptide aus Gesamt-Casein und aus α -Casein stellt man insgesamt eine gute Übereinstimmung fest, so daß an der Identität mindestens des Peptidanteiles der verschiedenen Präparate nicht zu zweifeln ist. Daß unser Präparat allerdings nicht ganz rein sein kann, geht daraus hervor, daß auch Spuren von Histidin, Arginin, Tyrosin und Phenylalanin gefunden wurden, gleich wie bei den früher¹ untersuchten Präparaten GMP (a)2 und GMP (b)1. Der Peptidanteil, einschließlich NH₃, beträgt bei unserem Präparat 60,4% (berechnet aus den Werten der ersten Zahlenkolonne der Tabelle unter Abzug von 67 Mikromolen H₂O pro 10 mg Substanz). Dieser Wert stimmt ebenfalls sehr gut mit dem von JOLLÈS und ALAIS² angegebenen überein.

Summary

Rennin releases from *k*-casein a glyco-macropptide which is identical with the one previously obtained from α -casein and from whole casein. All preparations have the same quantitative amino-acid composition. As *k*-casein has been recognised to be the protective colloid of the calcium-caseinate micelles in milk, this fact supports the assumption that the splitting off of this glyco-macropptide is the decisive reaction in the rennet-clotting of milk.

Von Hs. NITSCHMANN und R. BEEBY*

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