

KURZE MITTEILUNGEN

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

Über die Abspaltung eines Glyko-makropeptides bei der Einwirkung von Pepsin auf Casein bei pH 6,8*

Bei der Primärreaktion der Labung von Casein aus Kuhmilch wird ein Glyko-makropeptid abgespalten. Die quantitative Aminosäurezusammensetzung von Glyko-makropeptiden, die bei der Labung von Gesamtcasein^{2,3}, α -Casein³, k -Casein^{1,5} gewonnen wurden, sind recht gut übereinstimmend, und es wird angenommen, daß das k -Casein das eigentliche Substrat für die Primärreaktion der Labgerinnung der Milch ist¹. Milch wird nicht nur von Lab, sondern auch von Pepsin, Chymotrypsin und Papayotin zur Gerinnung gebracht. Trägt man den bei

pH 6,8 durch die genannten Enzyme freigesetzten, in 12prozentiger Trichloressigsäure löslichen Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) gegen die Inkubationszeit auf, so haben die Kurven alle ein gemeinsames Merkmal: Die Umsatzgeschwindigkeit ist zu Beginn der Reaktion am größten und nimmt, wenn der NPN etwa 2% des Gesamt-N erreicht hat, rasch ab. Der initiale rasche Kurvenanstieg fällt zeitlich mit der Primärreaktion der Gerinnung zusammen⁴. Mit Lab und Pepsin werden identische Kurven erhalten, die nach Beendigung der Primärreaktion nicht wesentlich weiter ansteigen. Es erhob sich die Frage, ob bei der Primärreaktion mit Pepsin ein

* Eingegangen am 27. März 1961.

gleiches oder ähnliches Peptid aus Casein abgespalten wird wie mit Lab. Es wird über vergleichende Analysen von mit Lab und Pepsin erhaltenen Peptiden berichtet.

Experimentelles

Die Peptide wurden nach NITSCHMANN und HENZI³, Methode b, unter Verwendung von Lab (Firma Marshall, Madison, Wis., USA) und kristallisiertem Pepsin (Firma Park & Davis, Detroit, Mich., USA) präpariert. Die quantitative Aminosäureanalyse wurde nach SPACKMAN, STEIN und MOORE⁶ durchgeführt. Für die quantitative Bestimmung der Zucker (nach Hydrolyse der Peptide in 1 N H₂SO₄) wurden folgende Methoden angewendet: Galaktose⁷, Galaktosamin⁸, Neuraminsäure⁸ und Xylose⁹. Galaktosamin und Xylose wurden wie folgt papierchromatographisch identifiziert: Nach Hydrolyse der Peptide in zugeschmolzenen Teströhrchen mit 1 N H₂SO₄ für 3 Stunden bei 100°C wurden die Hydrolysate nacheinander durch eine Säule von IR-45(OH⁻) und eine Säule von Dowex-50(H⁺) gegeben, unter jeweiligem Nachwaschen mit Wasser. Die mit dem Waschwasser kombinierten durchgetretenen Lösungen wurden gefriergetrocknet und die Substanzen in wenig Wasser gelöst. Die Papierchromatographie wurde auf Whatman(1)-Papier mit folgenden Lösungsmittelgemischen durchgeführt: I. *n*-Butanol-Pyridin-Wasser (5:3:2 v/v); II. *n*-Butylacetat-Eisessig-Äthanol-Wasser (3:2:1:1 v/v); III. Methyläthylketon-Aceton-Ameisensäure-Wasser (3:1:0,1:0,6 v/v). Indikator: 2% Anilinhydrogenphthalat in mit Wasser gesättigtem Butanol.

Galaktose und Xylose wurden identifiziert.

Zum Nachweis von Aminozuckern wurde die Dowex-50-Säule mit 0,5 N HCl eluiert und die Eluate zur Vertreibung von HCl im Vakuum eingengt. Die Einengung wurde nach Zugabe von etwas Wasser mehrmals wiederholt und die Substanz schließlich im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in wenig Wasser gelöst und mit *n*-Butanol-Pyridin-0,25 N HCl (5:3:2 v/v) für 48 Stunden bei Zimmertemperatur auf Papier chromatographiert. Galaktosamin wurde nachgewiesen. Um Galaktosamin als solches sicher zu identifizieren, wurde es auf dem Papier mit Ninhydrin oxydiert und dann weiter für 20 Stunden mit Lösungsmittelgemisch I chromatographiert. Als Oxydationsprodukt wurde Lyxose gefunden und damit die Identität des Aminozucker mit Galaktosamin sichergestellt.

Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Zum Vergleich nahmen wir die von NITSCHMANN und HENZI für eines ihrer Präparate angegebenen Werte³ in die Tabelle mit auf.

Wie bei dem mit Lab erhaltenen Peptid handelt es sich bei dem mit Pepsin hergestellten Präparat um ein Glyko-makropeptid. Der Peptidanteil beträgt in beiden Fällen, von Präparat zu Präparat schwankend, 60 bis 65%.

Die Daten für die Aminosäuren der drei mit Lab gewonnenen Glykomakropeptide stimmen recht gut überein; die Schwankungen sind kaum größer als von anderer Seite beschrieben³. Die Analysenwerte für das mit Pepsin gewonnene Präparat weichen in Glutaminsäure und Alanin etwas stärker ab. Ob es sich hierbei um Analysenfehler oder um tatsächliche Unterschiede handelt, vermögen wir vorerst noch nicht sicher zu entscheiden, da nur eines unserer mit Pepsin erhaltenen Präparate bisher quantitativ untersucht wurde. Immerhin glauben wir uns zu der Aussage berechtigt, daß das

Tabelle 1: Quantitative Analyse von Glyko-makropeptiden

Die Werte für Zucker, N und P sind angegeben in % bezogen auf das Gesamtpeptid, die Werte für Aminosäuren sind angegeben in % bezogen auf den Peptidanteil.

- I: gewonnen mit Lab
 II: gewonnen mit Lab. Werte angegeben von NITSCHMANN und HENZI³ für ihr Präparat GMP(b)1
 III: gewonnen mit Lab. Ein Präparat von NITSCHMANN und HENZI, von uns mit untersucht
 IV: gewonnen mit Pepsin

Präparat	I	II	III	IV
Galaktosamin	3,8	3,4*	3,0	3,6
Neuraminsäure	25,6	10,0	10,9	16,9
Galaktose	7,5	9,4	6,4	8,2
Xylose	—	—	4,5	—
Total	36,9	22,7	25,2	28,7
N	11,6	10,8	—	12,0
P	0,7	0,25	—	0,8
Asp	7,5	8,4	7,7	7,9
Glut	18,0	18,8	18,6	15,2
Ser	10,2	7,9	9,6	7,5
Threo	17,6	16,9	18,0	17,9
Prol	11,6	11,8	10,0	13,6
Val	8,8	8,9	9,5	7,9
Leu	1,9	1,9	2,2	2,8
Isoleu	9,3	10,6	9,4	7,7
Ala	7,3	6,1	8,7	11,8
Gly	1,9	1,1	1,8	1,2
Lys	5,8	6,1	5,0	6,8

* Von NITSCHMANN und HENZI als Glucosamin angegeben.

mit Pepsin aus Casein abgespaltene Glyko-makropeptid dem mit Lab gewonnenen Präparat in seinem Peptidanteil sehr ähnlich, wenn nicht mit diesem identisch ist.

Bezüglich des Zuckeranteils schwanken die Werte schon mit Lab von Präparat zu Präparat erheblich³, besonders für Neuraminsäure, so daß sich diese Ergebnisse nur in qualitativer Hinsicht für einen Identitätsbeweis heranziehen lassen.

Bisher wurde von den verschiedenen Autoren^{3,5} als Aminozucker Glucosamin angegeben. Mit der beschriebenen Methode konnten wir uns jedoch davon überzeugen, daß es sich um Galaktosamin handelt. In dem von uns mit untersuchten Präparat von NITSCHMANN und HENZI fanden wir darüber hinaus eine Pentose, die als Xylose identifiziert wurde. Die anderen Präparate sind noch nicht auf Pentosen untersucht.

Auf eine Beobachtung soll noch besonders hingewiesen werden. Bei der Darstellung der Glyko-makropeptide aus Casein fanden wir mit Pepsin immer eine um etwa 50% geringere Ausbeute als mit Lab. Eine Erklärung hierfür haben wir noch nicht.

Das Ergebnis der vorliegenden Versuche zeigt, daß es sich bei der Gerinnung der Milch mit Lab und Pepsin um die gleiche Primärreaktion, d. h. die Abspaltung eines Glyko-makropeptids aus dem Casein, handelt. Die mit Lab und Pepsin erhaltenen Glyko-makropeptide sind in

ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich, wenn nicht identisch. Dieser Befund steht in Einklang mit der von FISH¹⁰ durch Abbauprobungen an der B-Kette des Insulins festgestellten großen Ähnlichkeit in der Spezifität der beiden Fermente.

Summary

Pepsin releases from casein a glyco-macropptide which is in its aminoacid and sugar composition very similar, if not identical with the glyco-macropptide released by RENNET under the same conditions.

Ein Teil der Arbeit wurde aus Mitteln eines Forschungskredits (H-5975) der National Institutes of Health, Bethesda (Md., USA) unterstützt.

Literatur

- ¹ H. NITSCHMANN und R. BEEBY, *Chimia* 14 (1960) 318.
- ² P. JOLLES und C. ALAIS, *Biochim. Biophysica Acta* 34 (1959) 565.
- ³ H. NITSCHMANN und R. HENZI, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 1985.
- ⁴ H. MATTENHEIMER und H. NITSCHMANN, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 1969.
- ⁵ P. JOLLES und C. ALAIS, *C. R. Séances Acad. Sci.* 251 (1960) 2605.
- ⁶ D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN und ST. MOORE, *Anal. Chem.* 30 (1958) 411.
- ⁷ H. MASAMUNE und H. SAKAMOTO, *Tohoku J. Exper. Med.* 63 (1956) 345.
- ⁸ H. MASAMUNE und Z. YOSIZAWA, *Tohoku J. Exper. Med.* 65 (1957) 169.
- ⁹ W. MEYBAUM, *Z. Physiol. Chem.* 258 (1939) 117. Z. DISCHE, *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 983.
- ¹⁰ J. C. FISH, *Nature* 180 (1957) 345.

W. HABERMANN

Physiologisch-Chemisches Institut der Freien Universität Berlin

H. MATTENHEIMER, H. SKY-PECK und H. SINOHARA

Presbyterian-St. Luke's Hospital, Medical Department und Department of Biochemistry,
University of Illinois, Medical School, Chicago 12 (Ill., USA)