

Kurze Mitteilungen

Bis am 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen

Further Data on the Specificity of Rennin: The Rennin Sensitive Sequence of Sheep κ -Casein*

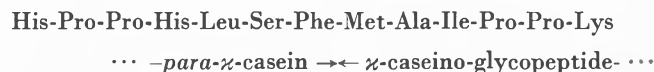
The primary enzymic phase of the action of rennin (EC 3.4.4.3) on casein in which the protective colloid is destroyed has been shown to be confined to the κ -fraction¹. In the case of cow κ -casein, rennin splits a Phe-Met bond^{2,3}. JOLLÈS *et al.*^{4,5} characterized a large tryptic peptide containing this rennin-sensitive linkage and established its structure: His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys. ALAIS and JOLLÈS⁶ purified two κ -casein-like fractions (κ_A and κ_B) from sheep casein which gave a high non protein nitrogen (NPN) proportion after rennin digestion. For comparative purposes it was thus interesting to determine the rennin sensitive tryptic peptide from sheep κ -casein. The overall amino acid compositions of sheep κ - and cow κ -caseins are near related, although not identical⁶; as the rennin-sensitive peptide of cow κ -casein contained high amounts of histidine and proline, we tried in a first series of experiments to purify in the tryptic digest of sheep κ -casein peptides containing these same amino acids.

Reduced aminoethylated sheep κ_A -casein was submitted to a tryptic digestion (200 mg κ -casein; 4 mg trypsin; 6 hr; 37°; pH 7.8). The enzymic hydrolysate was purified by chromatography on Dowex 1 \times 2 (140 \times 1.2 cm) as previously described^{4,5}. 23 peaks were characterized with the ninhydrin reagent after alkaline hydrolysis. Peaks 1, 6 and 11 contained higher amounts of proline and histidine.

The amino acid composition, the presence of sugars and the characterization of a C-terminal valine residue by the action of carboxypeptidase indicated that peak 11 constitutes the C-terminal tryptic peptide of sheep κ -casein as well as of sheep κ -caseino-glycopeptide^{2,6}.

Peaks 1 and 6 were rechromatographed on Dowex 50 \times 2.

Peak 1 gave rise to three (1a–1c) main peptides. Peptide 1a had the following composition: Ser₁, Pro₂, Leu₁, Phe₁, His₂, which was identical to that of the C-terminal tryptic peptide of cow *para*- κ -casein⁴. Thus the same methods⁴ (Edman procedure, carboxypeptidase) were employed to determine its structure: His-Pro-Pro-His-Leu-Ser-Phe. Peptide 1b. Amino acid composition: Ser₁, Pro₄, Ala₁, Met₁, Ile₁, Leu₁, Phe₁, His₂, Lys₁. The same peptide was already found in cow κ -casein⁴ and was constituted by the C-terminal sequence of *para*- κ -casein followed by the N-terminal sequence of the κ -caseino-glycopeptide⁷. However the sequence was determined again in detail in the case of the sheep peptide by methods previously described⁴ for the study of the peptide from cow κ -casein. Its structure was shown to be:



Peak 6 gave rise by rechromatography to two (6a, 6b) main peaks. Peak 6a was rich in proline and histidine. Its structure was identical to that of peptide 1a, which was thus eluted at two different places from the Dowex 1 \times 2 column.

Conclusion. Although cow κ - and sheep κ -caseins have slightly different amino acid compositions⁶ and must thus have different primary structures, we were able to establish that the rennin sensitive Phe-Met bond is situated in sheep κ -casein in a tryptic tridecapeptide identical to that characterized in cow κ -casein^{4,5}. Further studies dealing with caseins from various origins will establish if this sequence is absolutely necessary for the action of rennin or if some changes may be introduced.

This report is based on a part of a thesis (Docteur ès sciences) submitted by one of the authors (A.-M.F.) (No. AO 4512).

A.-M. FIAT*, CH. ALAIS** and J. JOLLÈS*

* 23rd communication on caseins; 22nd communication: C. ALAIS and P. JOLLÈS, *Int. J. Biochem.* 1970, in the press.

¹ D. F. WAUGH and P. H. VON HIPPEL, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4576.

² P. JOLLÈS, *Angew. Chem. Intern. Ed.* 5 (1966) 558.

³ A. DELFOUR, J. JOLLÈS, C. ALAIS and P. JOLLÈS, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 19(1965) 452.

⁴ J. JOLLÈS, C. ALAIS and P. JOLLÈS, *Biochim. Biophys. Acta* 168 (1968) 591.

⁵ J. JOLLÈS, P. JOLLÈS and C. ALAIS, *Nature* 222 (1969) 668.

⁶ C. ALAIS and P. JOLLÈS, *J. Dairy Sci.* 50 (1968) 1555.

* Laboratory of Biochemistry, Faculty of Science, 96, boulevard Raspail, Paris 6^e (France).

** Dairy Department, Faculty of Science, 54 Nancy (France).

⁷ A. DELFOUR, C. ALAIS and P. JOLLÈS, *Chimia* 20 (1966) 148.

Über die Wirkung von Al^{3+} -Ionen auf die Struktur der bei der Luftoxydation des Eisen-II-Carbonats entstehenden Eisen-III-Hydroxide

Während bei der Luftoxydation des im sauren Medium gefällten Eisen-II-Carbonats ausschließlich γ -FeOOH entsteht, ist das Bild in Gegenwart von Al^{3+} -Ionen ein anderes, indem diese als reaktionslenkender und gitterrichtender Faktor eine allmähliche Umwandlung des γ -FeOOH in α -FeOOH hervorrufen.

Die Bildung von γ -FeOOH aus Eisen-II-Carbonat ist seit langem bekannt¹. In letzter Zeit haben wir nun systematische Fällungen des Eisen-II-Carbonats durchgeführt, und zwar angefangen vom sauren Medium bis weit nach der alkalischen Seite hin. Dabei zeigte es sich, daß im sauren Medium ($FeSO_4 : Na_2CO_3 = 1 : 0,5$), wo der pH-Wert nach Fällung ~ 4 betrug, die Oxydation mit Luftsauerstoff zum γ -FeOOH führt, das weiter keine anderen röntgenographisch nachweisbaren Eisen-III-Hydroxid-Beimengungen enthält. Ein solches Präparat war nach dem Erhitzen auf 300° infolge Bildung von γ -Fe₂O₃ stark ferromagnetisch². Im Beisein von Al^{3+} -

Ionen wird die Sachlage insofern verändert, als nunmehr statt γ -FeOOH allmählich α -FeOOH aufkommt, wobei der Ferromagnetismus schließlich verschwindet, da jetzt bei 300° das paramagnetische α -Fe₂O₃ erscheint.

Zwecks Ausführung der Versuche löst man 6 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ in 100 cm³ dest. Wasser und versetzt dieses mit Na_2CO_3 -Lösung im Mol-Verhältnis $FeSO_4 : Na_2CO_3 = 1 : 0,5$ bei 20° . Al^{3+} -Ionen wurden in Form von $Al(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$ verwendet. Nach Auffüllung mit dest. Wasser auf 200 cm³ behandelt man das Reaktionsgemisch 3 Stunden lang mit einem Luftstrom (1,6 Liter/min) bei 20° . Die sorgfältig ausgewaschenen und luftgetrockneten Gele wurden analysiert sowie röntgenographisch und auf ihren Ferromagnetismus geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Durch den Al^{3+} -Zuschlag werden die Präparate naturgemäß $Al(OH)_3$ -haltig und wasserreicher. Auch etwas Sulfat ist vorhanden.

Tabelle 1. Luftoxydation des gefällten $FeCO_3$ in saurem Medium

Nr.	Mol-Verhältnis $FeSO_4 : Na_2CO_3$	Atom-Verhältnis $Fe^{2+} : Al^{3+}$	Oxidationsprodukte				Ferromagnetismus			Röntgenbefund
			% Fe_2O_3	% FeO	% Al_2O_3	% SO_3	% H_2O	direkt	bei 300°	
1	1 : 0,5	1 : 0	80,5	0,4	–	1,9	17,8	0	stark	γ -FeOOH
2	1 : 0,5	1 : 0,02	75,0	0,4	1,1	1,8	21,6	0	schwach	γ -FeOOH und α -FeOOH
3	1 : 0,5	1 : 0,05	63,0	0,3	6,0	2,0	28,7	0	0	α -FeOOH

¹ A. KRAUSE und Mitarbeiter, *Z. anorg. allg. Chem.* 219 (1934) 203.

² Die betreffende Literatur s. bei L. A. WELO und O. BAUDISCH, *Chem. Rev.* 15 (1934) 46.

ALFONS KRAUSE und EDMUND KOSTRZEWA

Forschungsanstalt des Instituts für Kommunale Wirtschaft,
Poznań (Polen)