

Fortschritte auf dem Gebiet der Casein-Chemie

VON DR. P. JOLLÈS

LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE, FACULTÉ DES SCIENCES,
UNIVERSITÉ DE PARIS, PARIS (FRANKREICH)

Kuhmilch-Casein ist keine einheitliche Substanz, sondern kann in zahlreiche Bestandteile zerlegt werden, darunter α -Casein, das als einzige Fraktion Zucker in nennenswerter Menge enthält. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Labgerinnung der Milch. Dabei wird es in einen fast zuckerlosen Teil, para- α -Casein, und einen zuckerhaltigen Teil, α -Caseino-Glykopeptid, gespalten. Caseino-Glykopeptide konnten nicht nur aus Kuhmilch-Casein, sondern auch aus dem Casein der Schaf-, Ziegen- und Muttermilch isoliert werden. Über die Labgerinnung der Milch und über die Aminosäuresequenz der Caseino-Glykopeptide wird anschließend berichtet.

I. Caseine

Die Proteine der Milch bestehen aus zwei Substanzgruppen: den Phosphoproteinen oder Caseinen (78 % [*]), die im sauren Medium unlöslich sind, und den Milchserumproteinen (17 % [*]) (β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Globuline, Serumalbumine, usw.). Außerdem sind noch 5 % Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) enthaltende Substanzen wie Peptide vorhanden. – (In dieser Arbeit werden stets Gewichtsprozente angegeben, bezogen auf die trockene Substanz.)

A. Kuhmilch-Casein

1. Anzahl und Namen der Fraktionen

Das Kuhmilch-Casein ist eine der wenigen Substanzen, die schon in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts isoliert und untersucht wurden [1–5]. Später zeigte sich [6–9], daß Casein keine reine Substanz ist. Löslichkeitsstudien in verdünnter Salzsäure und in Äthanol erlaubten Linderström-Lang und Kodama [10], im Casein sieben Fraktionen zu charakterisieren. Diese Beobachtungen wurden von Cherbuliez und Schneider [11] durch frak-

tionierende Aussalzung, von Pedersen [12] und besonders von Mellander [13] durch physikalische Untersuchungen bestätigt. Mellander konnte elektrophoretisch drei Hauptfraktionen isolieren, deren Namen noch heute benutzt werden: α , β - und γ -Casein.

Dank neuer chromatographischer oder elektrophoretischer Trennmethoden und der Benutzung harnstoffhaltiger Puffer, welche die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten herabsetzen, konnten bis zu 20 Caseinfractionen charakterisiert werden. Mit Waugh et al. [14] muß man sich jedoch fragen, welche Fraktionen direkt von den Zellen in der Milchdrüse synthetisiert werden („Primärcaseine“), und welche Fraktionen z. B. durch enzymatischen Abbau dieser Primärcaseine entstehen. Einige Fraktionen können auch genetische Varianten sein sowie Assoziate oder Gemische mehrerer Proteine. Die vier Hauptfraktionen des Caseins („Primärcaseine“) sind die α_{s1} -, α_{s2} -, β - und α -Komponenten. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Fraktionen des Caseins angegeben sowie die Namen, unter denen man sie in der Literatur antrifft.

2. Studium der vier Hauptfraktionen

a) α_{s1} - und α_{s2} -Casein

Nomenklatur und Reinigung. Obwohl das α -Casein elektrophoretisch homogen schien (löslich in 6,6 M, unlöslich in 4,6 M Harnstoff-Lösung), konnte es in zwei Hauptfraktionen getrennt werden: das α -Casein, löslich in Gegenwart von Ca^{2+} , und das α_s -Casein, unlöslich in Gegenwart von Ca^{2+} (0,03 M) bei normalen (20–40 °C) wie auch bei tieferen Temperaturen (1–5 °C). Waugh und v. Hippel [15] gaben diesen Fraktionen die Namen. Die α_s -Fraktion ist der α_1 -Fraktion von McMeekin et al. [16] und der α_r -Fraktion von Long [17] sehr ähnlich.

α_s -Casein kann auch durch Fällung des Caseins mit CaCl_2 gewonnen werden [15]. Bei der Chromatographie

[*] Im Fall der Kuhmilch.

- [1] H. Braconnot, Ann. Chim. Physique 43, 337 (1830).
- [2] T. A. Quévenne, Ann. Hyg. publ. 26, 257 (1842).
- [3] J. B. Dumas u. C. Cahours, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 15, 976 (1842).
- [4] N. Liberkühn, Poggendorffs Ann. Physik. Chem. 86, 117, 298 (1852).
- [5] E. Millon u. A. Commaille, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 60, 118, 859 (1865).
- [6] A. Danilewsky u. P. Radenhausen, Forsch. Gebiet Viehhaltg. Erzeugn., Nr. 9 (1880).
- [7] O. Hammarsten, Jber. Fortschr. Tierchem. 2, 118 (1872).
- [8] T. Mann: Chemistry of the Proteids. MacMillan, New York 1906, S. 403.
- [9] T. B. Osborne u. A. J. Wakeman, J. biol. Chemistry 33, 243 (1918).
- [10] K. Linderström-Lang u. S. Kodama, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 16, Nr. 1, 48 (1925).
- [11] E. Cherbuliez u. M. C. Schneider, Helv. chim. Acta 15, 597 (1932).

[12] K. O. Pedersen, Biochem. J. 30, 948 (1936).

[13] O. Mellander, Biochem. Z. 300, 240 (1939).

[14] D. F. Waugh, M. L. Ludwig, J. M. Gillespie, B. Melton, M. Foley u. E. S. Kleiner, J. Amer. chem. Soc. 84, 4929 (1962).

[15] D. F. Waugh u. P. v. Hippel, J. Amer. chem. Soc. 78, 4576 (1956).

[16] T. L. McMeekin, N. J. Hipp u. M. L. Groves, Arch. Biochem. Biophysics 83, 35 (1959).

[17] J. Long, Q. van Winkle u. I. A. Gould, J. Dairy Sci. 41, 417 (1958).

Tabelle 1. Die wichtigsten Fraktionen des Casein-Komplexes.

[13]		[15]		[14]		[33]		Anderer Name f. ähnl. Fraktionen	Nebenfraktion	Genet. Varianten
Name	[%]	Name	[%]	Name	[%]	Name				
α	70	α_B	55	α_{S1} { $\alpha_{S1,2}$	38		α_1 oder α_T	, α_S (10 %)	$\alpha_{S1}-A, -B, -C, -BC, -D$	
		x	15	α_{S2} { x	15		α_3 $\alpha_2, \text{,,m''}$	λ (3 %) ←	x-A, -B	
β	27			β	27	{ β_{langsam} $\beta_{\text{schnell}} [a]$			$\beta-A, -B, -C$	
γ	3								$\gamma-A, -B$	

[a] β_{schnell} ist wahrscheinlich in λ enthalten.

auf DEAE-Cellulose mit einem 4,5 M Harnstoff enthaltenden Puffer erhielt man aus dem α_S -Casein zwei Fraktionen; beide konnten durch Stärkegel-Elektrophorese nochmals zerlegt werden [14]. Die erste Fraktion bei der Chromatographie enthielt ein Gemisch von α_{S1} - und α_{S2} -Caseinen (= $\alpha_{S1,2}$ -Caseine). Die α_{S1} -Komponente wandert bei pH = 8,4 schneller als die α_{S2} -Komponente. Die zweite Fraktion erhielt den etwas verwirrenden Namen „ α_S -Casein“ (= Fraktion, die andere „ α_S -ähnliche“ Komponenten enthält).

Drei genetische Varianten konnten Thompson et al. [18–21, 27, 28] identifizieren: $\alpha_{S1}-A$, $\alpha_{S1}-B$ und $\alpha_{S1}-C$; die beiden letzten sind wahrscheinlich der Waugh'schen Fraktion $\alpha_{S1,2}$ sehr ähnlich oder gleich. de Koning [22] beschrieb die Varianten $\alpha_{S1}-B$, $\alpha_{S1}-C$, $\alpha_{S1}-BC$ und $\alpha_{S1}-D$.

Molekulargewicht. α -Casein bildet im neutralen Medium Aggregate, deren Größe jedoch mit steigendem pH-Wert abnimmt: durch Sedimentation oder Diffusion fanden McKenzie und Wake [23] als Molekulargewicht 27600 ± 1000 bei pH = 7,3 und 24800 ± 1000 bei pH = 11 in Anwesenheit von 6 M Harnstoff; für $\alpha_{S1,2}$ -Caseine fanden Waugh et al. 27000 [14] und Schmidt und Payens [24] 16500; Manson [25] fand für das α -Casein ein Molekulargewicht von mindestens 31000 (siehe Tabelle 2); de Koning [22] ermittelte ein Molekulargewicht von 30000. Analysen (Aminosäuren, Zucker, Phosphor). Die Aminosäurezusammensetzungen der α_{S1} - und α_{S2} -Caseine gaben Hipp und Mitarbeiter an [26]. Die $\alpha_{S1,2}$ -Caseine enthalten 14,7 % N; 1,03 % P; 2,3 Tryptophan- und 11 Tyrosinreste pro Molekül vom Molekulargewicht 27000.

Tabelle 2. Eigenschaften verschiedener Casein-Fraktionen.

Casein-Fraktion	Molekulargew.	pH _i	Löslichkeit in Gegenwart v. 0,03 M Ca ²⁺		Zucker [%]	P [%]	Cys [%]	N [%]	Terminale Amino-säuren oder Sequenzen	Lab-Ein-wirkung
			[a]	4 °C					N C	
α [13]	24800–27600									
α_S [15]	16500–27000	4,4	—	—	0	1,1	0,44	15,10	Arg	—
$\alpha_{S1,2}$ [14]	27000				0	1,03	0	14,70	(Try, Leu, Tyr)	—
$\alpha_{S1}-A$ [29, 30]	≈ 30000					1,01		15,10	Leu-Try	—
$\alpha_{S1}-B$ [29, 30]	≈ 30000					1,01		15,34	Arg	—
$\alpha_{S1}-C$ [29, 30]	≈ 30000					1,01		15,40	Leu-Try	—
$\alpha_{S1}-D$ [22]									Arg	—
x [15]	wahrscheinlich 19000 ± 1000 [56, 58] [b]	3,7	+/-	+	5,0	0,2	1,4	14,5	?	(Ser, Thr, Ala)-Val
						(0,19– 0,35)		(13,5– 15,4)		+
λ [17]						1,2				?
β [13]	18000–25000	4,9	+	+	0–0,2	0,48– 0,6	≈ 0,1	15,35– 15,47	Ileu-(Val, Ileu)	—
β_{schnell} [33]						1,11				—
β_{langsam} [33]						0,68				—
$\beta-A$ [27, 39a]						0,59		15,18		—
$\beta-B$ [27, 39a]						0,57		15,33		—
$\beta-C$ [27, 39a]						0,50		15,45		—
γ [13]	30000	6,4				0,14	0			—

[a] Isoelektrischer Punkt.

[b] Früher angenommen: 2 × 28000 [65].

[18] M. P. Thompson, C. A. Kiddy, L. Pepper u. C. A. Zittle, J. Dairy Sci. 45, 650 (1962).

[19] M. P. Thompson, C. A. Kiddy, L. Pepper u. C. A. Zittle, Nature (London) 195, 1001 (1962).

[20] C. A. Kiddy u. J. O. Johnston, J. Dairy Sci. 47, 147 (1964).

[21] C. A. Kiddy, M. P. Thompson, J. O. Johnston u. L. Pepper, J. Dairy Sci. 46, 626 (1963).

[22] P. J. de Koning, Vortrag auf dem internat. Circle of Dairy Research Leaders, Meeting on Caseins, Jouy-en-Josas (1965).

Im α -Casein (Gemisch von hauptsächlich $\alpha_{S1,2}$ - und α -Caseinen) findet man Zucker; diese sind jedoch nur in den x-Komponenten enthalten. de Koning [22] analysierte die genetischen Varianten $\alpha_{S1}-B$, $-C$, $-BC$ und $-D$:

[23] H. A. McKenzie u. R. G. Wake, Austral. J. Chem. 12, 734 (1959).

[24] D. G. Schmidt u. T. A. J. Payens, Biochim. biophysica Acta 78, 492 (1963).

[25] W. Manson, Arch. Biochem. Biophysics 95, 336 (1961).

[26] N. J. Hipp, J. J. Basch u. W. G. Gordon, Arch. Biochem. Biophysics 94, 35 (1961).

α_{S1} -B enthält einen Glutaminsäurerest mehr und einen Glycinrest weniger als α_{S1} -C-Casein.

Strukturstudien. Arginin ist die einzige N-terminale Aminosäure nicht nur des α_S -Caseins ($3,25 \text{ Mol}/10^5 \text{ g Protein}$)^[25], sondern auch der Varianten α_{S1} -A, -B, -C^[29] und -D^[22]. Die C-terminalen Sequenzen dieser Komponenten sind ebenfalls gleich: Leucyl-tryptophan, wenn sie alle aus einer einzigen Polypeptidkette (Molekulargewicht ≈ 31000) bestehen sollten; falls jedoch zwei Peptidketten vorliegen^[24], müßte die eine einen C-terminalen Leucin- und die andere einen C-terminalen Tryptophan-Rest haben. Die Resultate stimmen nicht ganz mit denen von Waugh et al.^[14] überein, die Tryptophan, Leucin und Tyrosin als C-terminale Aminosäuren der $\alpha_{S1,2}$ -Caseine fanden.

Viele Arbeiten befassen sich mit Peptiden, besonders Phosphopeptiden aus α -Casein. Österberg berichtet von einem Peptid aus 35 Aminosäuren und zitiert in diesem Zusammenhang die meisten bis jetzt untersuchten Phosphopeptide aus Casein^[31]. Der Phosphor kommt im Casein hauptsächlich als Monoester der Phosphorsäure vor (Phosphoserin, Phosphothreonin).

b) β -Casein

Reinigung. Groves et al.^[32] beschrieben 1962 ein Reinigungsverfahren durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose, welches als Ausgangsmaterial das bei pH = 4 und 2 °C lösliche Casein benutzt. Das erhaltene Präparat schien elektrophoretisch rein zu sein (löslich in 4,6 M, unlöslich in 3,3 M Harnstoff-Lösung bei pH = 4,6); jedoch konnten Gehrke et al.^[33] 1964 durch ähnliche Methoden zeigen, daß ein solches β -Casein aus zwei Komponenten besteht: „ β -langsam“ (Hauptkomponente), wasserlöslich bei 5 °C, und „ β -schnell“. Garnier et al.^[34] veröffentlichten gleichfalls 1964 ein Herstellungsverfahren für β -Casein.

Auch beim β -Casein konnten genetische Varianten charakterisiert werden^[27, 28, 35–37]: β -A, β -B und β -C^[39]. Eine neue Nomenklatur, die sich auf den schwanken-

- [27] M. P. Thompson u. L. Pepper, J. Dairy Sci. 47, 293, 633 (1964).
- [28] M. P. Thompson, L. Pepper, W. G. Gordon u. J. J. Basch, J. Dairy Sci. 46, 607 (1963).
- [29] E. B. Kalan, M. P. Thompson u. R. Greenberg, Arch. Biochem. Biophysica 107, 521 (1964).
- [30] M. P. Thompson u. C. A. Kiddy, J. Dairy Sci. 47, 626 (1964).
- [31] R. Österberg, Acta chem. scand. 18, 795 (1964).
- [32] M. L. Groves, T. L. McMeekin, M. J. Hipp u. W. G. Gordon, Biochim. biophysica Acta 57, 197 (1962).
- [33] C. W. Gehrke, C. W. Freark, Y. H. Oh u. P. W. Chun, Analytic. Biochem. 9, 423 (1964).
- [34] J. Garnier, B. Ribadeau-Dumas u. G. Mocquot, J. Dairy Res. 31, 131 (1964).
- [35] R. Aschaffenburg, Nature (London) 192, 431 (1961).
- [36] R. Aschaffenburg, J. Dairy Res. 30, 251 (1963).
- [37] M. P. Thompson, C. A. Kiddy, J. O. Johnston u. R. M. Weinberg, J. Dairy Sci. 47, 378 (1964).
- [38] W. G. Gordon, R. S. Cable u. R. Morris, J. Amer. chem. Soc. 71, 3293 (1949).
- [39] R. Pion, J. Garnier, B. Ribadeau-Dumas, P. J. de Koning u. P. J. van Rooyen, Biochem. biophysic. Res. Commun. 20, 246 (1965).

den Histidingerhalt bezieht, wurde soeben vorgeschlagen^[39a].

Molekulargewicht. McKenzie und Wake^[23] gaben für noch nicht ganz reine β -Caseinpräparate Molekulargewichte von 17300 ± 800 bei pH = 11 und 19800 ± 1000 bei pH = 7 in 6 M Harnstoff-Lösung an. Groves et al.^[32] fanden bei pH = 7 (0,05 M Phosphatpuffer; NaCl 0,1 M) und 0,8 °C eine Sedimentationskonstante von 1,17 S, Gehrke^[33] eine solche von 1,6 S für β -langsam (0,076 M Trispuffer–0,005 M Citrat; pH = 8,6). Assoziation und Dissoziation wurden in Anwesenheit von 0,1 M KCl beobachtet.

Analysen. β -schnell-Casein enthält ebensoviel Phosphor wie λ -Casein, und auch elektrophoretisch ist ihr Verhalten verwandt: wahrscheinlich ist β -schnell-Casein eine Fraktion des λ -Caseins (oder der λ -Caseine). Die Aminosäurezusammensetzung des β -Caseins gaben Gordon et al.^[38] und Pion et al.^[39] an. Zucker konnten nur spurenweise nachgewiesen werden.

Strukturstudien. Einige Arbeiten befaßten sich mit der Isolierung von Phosphopeptiden oder mit dem tryptischen Hydrolysat von Gesamt- β -Casein^[39–41]. Die genetischen Varianten β -B und β -C enthalten einen Arginin- bzw. einen Lysinrest mehr und je einen Glutaminsäurerest weniger als β -A^[39].

β -Casein kann bei pH = 8,6 und 37 °C photooxidiert werden: besonders die Histidin-, Tryptophan- und Tyrosinreste werden dabei reduziert und/oder abgespalten; oxidiertes β -Casein (18 Mol O₂/30000 g Casein) wird von CaCl₂-Lösung nicht mehr gefällt^[42].

c) α -Casein

In Gegenwart von 0,3 M Ca²⁺ wird der Komplex zwischen den α_S -, β - und γ -Caseinen zerstört; nur das α -Casein bleibt in Lösung^[15]. Weitere ungewöhnliche Eigenschaften des α -Caseins sind die Fähigkeit, andere Casein-Fraktionen zu stabilisieren; ferner ist α -Casein die einzige Casein-Fraktion, die durch das Lab angegriffen wird, und die einzige zuckerreiche Casein-Fraktion.

Reinigung. α -Casein, das ein Teil von Mellanders α -Casein ist, verdankt seinen Namen Waugh und v. Hippel^[15]; es ist eine der α_3 -Komponente von Hipp et al.^[26] sehr verwandte Fraktion und kann durch Fraktionieren von Gesamt-Casein gewonnen werden^[43–55],

- [39a] R. F. Peterson u. F. C. Kopfler, Biochem. biophysic. Res. Commun. 22, 388 (1966).
- [40] R. F. Peterson, L. W. Neumann u. T. L. MacMeekin, J. Amer. chem. Soc. 80, 95 (1958).
- [41] M. Pantlitschko u. E. Gründig, Mh. Chem. 89, 489 (1958).
- [42] C. A. Zittle, E. B. Kalan, M. Walter u. T. M. King, J. Dairy Sci. 47, 1052 (1964).
- [43] H. A. McKenzie u. R. G. Wake, Biochim. biophysica Acta 47, 240 (1961).
- [44] H. E. Swaisgood u. J. R. Brunner, J. Dairy Sci. 45, 1 (1962).
- [45] C. A. Zittle, J. Dairy Sci. 45, 650 (1962).
- [46] R. D. Hill u. R. R. Hansen, J. Dairy Res. 30, 375 (1963).
- [47] T. A. J. Payens, Biochim. biophysica Acta 46, 441 (1961).
- [48] G. C. Cheeseman, J. Dairy Res. 29, 163 (1962).
- [49] R. D. Hill, J. Dairy Res. 30, 101 (1963).
- [50] C. A. Zittle u. J. H. Custer, J. Dairy Sci. 46, 1183 (1963).

z. B. mit Trichloressigsäure und Harnstoff^[44], oder durch Chromatographie^[46].

α -Casein verhält sich bei Stärkegel-Elektrophoresen uneinheitlich. Sowohl *Woychik*^[56,57] als auch *Wake*^[58] und *Schmidt*^[59] konnten nach Reduktion zu „SCM- α -Casein“ zwei Haupt- und einige Nebenfraktionen charakterisieren. Bei der Chromatographie auf DEAE-Cellulose mit 20 % Dimethylformamid enthaltenden Puffern wurde das SCM- α -Casein in zwei zuckerreiche (schneller laufende) und in zwei zuckerlose Fraktionen zerlegt. Alle diese Komponenten können von Lab angegriffen werden. Der Zuckergehalt scheint also bei der Labgerinnung keine Rolle zu spielen. Die Heterogenität des α -Caseins (aus der Milch mehrerer Tiere) ist auf genetische Varianten (siehe unten) sowie auf die Anwesenheit mehr oder weniger großer Mengen Zucker im Caseino-Glykopeptidteil zurückzuführen. Jahreszeitliche Schwankungen in der Aminosäurezusammensetzung wurden ebenfalls festgestellt^[60].

Molekulargewicht. Bei pH = 7 (0,1 M Phosphatpuffer) beträgt die Sedimentationskonstante $s_{20}^c = 12,9$ S (polymere Form, Aggregate); bei pH = 12,2 (0,19 M Phosphat-KOH-Puffer) ist sie $s_{20}^{c=0} = 1,4$ S^[43,44]. Für das Molekulargewicht des α -Caseins wurden in der Literatur Werte zwischen 26000 ± 3000^[61,66] und 160000^[62], ja sogar 280000^[47] angegeben. *Swaisgood* und *Brunner*^[63] nahmen einen Wert zwischen 50000 und 60000 an; *Beeby*^[64] vermutete drei Untereinheiten vom Molekulargewicht 16000, die sich im Neuraminsäure- und Cystingehalt unterscheiden sollten. 1964 schlossen *Swaisgood* et al.^[65] aus Studien am reduzierten α -Casein, daß das α -Casein wahrscheinlich aus zwei Untereinheiten vom Molekulargewicht 28000 besteht. Dieses Molekulargewicht konnte auch aus den Schwefel-, Phosphor- und Neuraminsäuregehalten abgeleitet werden. Neueste Versuche von *Woychik*^[56,57] (Analyse genetischer Varianten, Sedimentationskonstante von Carbamoylmethyl- α -Casein) und von *Wake*^[58] (Arbeiten

- [51] R. G. Wake u. R. L. Baldwin, *Biochim. biophysica Acta* 47, 225 (1961).
[52] J. M. Neelin, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 40, 693 (1962).
[53] J. Garnier, B. Ribadeau-Dumas u. J. Gautreau in: XVI. internat. Dairy Congress, Kopenhagen 1962, S. 655.
[54] D. Rose u. J. R. Marier, *J. Dairy Sci.* 46, 1323 (1963).
[55] A. G. MacKinlay u. R. G. Wake, *Biochim. biophysica Acta* 93, 378 (1964).
[56] J. H. Woychik, Vortrag auf dem internat. Circle of Dairy Research Leaders, Meeting on Caseins, Jouy-en-Josas (1965).
[57] E. B. Kalan u. J. H. Woychik, *J. Dairy Sci.* 48, 1423 (1965).
[58] R. G. Wake, Vortrag auf dem internat. Circle of Dairy Research Leaders, Meeting on Caseins, Jouy-en-Josas (1965).
[59] D. G. Schmidt, Vortrag auf dem internat. Circle of Dairy Research Leaders, Meeting on Caseins, Jouy-en-Josas (1965).
[60] O. Kirchmeier, *Milchwissenschaft* 20, 448 (1965).
[61] H. E. Swaisgood u. J. R. Brunner, *J. Dairy Sci.* 44, 1163 (1961).
[62] R. A. Gibbons u. G. C. Cheeseman, *Biochim. biophysica Acta* 56, 354 (1962).
[63] H. E. Swaisgood u. J. R. Brunner, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 12, 148 (1963).
[64] R. Beeby, *J. Dairy Res.* 30, 77 (1963).
[65] H. E. Swaisgood, J. R. Brunner u. H. A. Lillevik, *Biochemistry* 3, 1616 (1964).
[66] H. A. McKenzie u. R. G. Wake, *Austral. J. Chem.* 12, 734 (1959).

mit Fraktionen, die aus SCM- α -Casein gewonnen wurden) zeigten, daß das Molekulargewicht höchstwahrscheinlich um 19000 ± 1000 liegt. Dieser Wert ist auch im Einklang mit den ersten Resultaten von *Jollès* et al.^[67] bezüglich der chemischen Struktur des α -Caseins. Genetische Varianten des α -Caseins konnten *Woychik*^[56,68,69], *Neelin*^[70] und *Schmidt*^[59,71] durch Stärkegel-Elektrophorese feststellen.

Analysen. *Jollès* et al.^[72] sowie *Swaisgood* et al.^[63,65] untersuchten die Zusammensetzung des α -Caseins. Besonders hervorzuheben ist der hohe Gehalt an Hydroxyaminoäuren, Glutaminsäure und Prolin, sowie das Vorkommen von Cystin. Die Aminosäureanalysen von genetischen Varianten (α -A und α -B) sind von *Woychik*^[56] und *Schmidt*^[59] angegeben worden. Die Differenzen betreffen je einen Rest von Asparaginsäure, Threonin, Alanin und Isoleucin.

Das α -Casein ist die einzige zuckerreiche Fraktion des gesamten Caseinkomplexes: Galaktose, Galaktosamin (und nicht wie früher angenommen Glucosamin) und N-Acetylneuraminsäure konnten von *Alais* und *Jollès*^[73] nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. Für den Gehalt an Neuraminsäure sind sehr verschiedene Werte angegeben worden: entweder geht ein Teil dieses Zuckers während der Reinigung verloren, oder die Milch enthält α -Casein mit verschiedenen Zuckergehalten^[48,49,73–79]. Der Phosphor-Gehalt (0,22 %) ist kleiner als bei den anderen Hauptfraktionen.

Strukturstudien. Während der Labgerinnung der Milch wird hauptsächlich das α -Casein angegriffen. Aus diesem Grund werden wir über seine Struktur im zweiten Teil dieser Zusammenfassung berichten.

Biologische Aktivität. *Yaguchi* et al.^[80] stellten fest, daß mehrere Casein-Fraktionen, in denen die α -Komponente anwesend war, sich gegenüber Milchfett bei pH = 9 wie eine Lipase verhielten.

α -Casein als Schutzkolloid. Wechselwirkungen mit anderen Casein-Fraktionen. Bildung der Micellen. In Anwesenheit von Calcium-Ionen sind die α_s -Caseine und das β -Casein bei Zimmertemperatur unlöslich in Wasser, während sich das α -Casein löst. α -Casein stabilisiert die kolloide Dispersion des Calcium-caseinates. Stabile Suspensionen von Micellen entstehen nach *Waugh*^[81], wenn α_s - und α -Caseine im Gewichtsverhältnis 4:1 (Ca²⁺ 0,03 M; 37 °C) vorhanden

- [67] J. Jollès, A. Delfour, C. Alais u. P. Jollès, unveröffentlicht.
[68] J. H. Woychik, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 16, 267 (1964).
[69] J. H. Woychik, *J. Dairy Sci.* 48, 496 (1965).
[70] J. M. Neelin, *J. Dairy Sci.* 47, 506 (1964).
[71] D. G. Schmidt, *Biochim. biophysica Acta* 90, 411 (1964).
[72] P. Jollès, C. Alais u. J. Jollès, *Arch. Biochem. Biophysics* 98, 56 (1962).
[73] C. Alais u. P. Jollès, *Biochim. biophysica Acta* 51, 315 (1961).
[74] B. Johansson u. L. Svennerholm, *Acta physiol. scand.* 37, 324 (1956).
[75] C. Alais, Dissertation, Universität Paris, 1962.
[76] L. Reynolds, G. O. Hanneberry u. B. E. Baker, *J. Dairy Sci.* 42, 1463 (1959).
[77] M. N. Cayen, G. O. Hanneberry u. B. E. Baker, *J. Dairy Sci.* 45, 706 (1962).
[78] R. A. Gibbons, *Biochem. J.* 73, 209 (1959).
[79] F. Albanico, S. Sarachi u. A. Zanini, *Latte* 38, Nr. 5 (1964).
[80] M. Yaguchi, N. P. Tarassuk u. N. Abe, *J. Dairy Sci.* 47, 1167 (1964).
[81] D. F. Waugh, *Discuss. Faraday Soc.* 25, 186 (1958).

sind. Wenn dieses Verhältnis größer als 4 ist, fällt überschüssiges α_s -Casein aus; ist das Verhältnis kleiner als 4, bilden sich kleinere Micellen. Diese Assoziation zwischen κ - und α_s -Caseinen wurde in neutraler Lösung studiert [82]. Wechselwirkungen können auch zwischen κ - und β -Caseinen [83] oder κ -, α_s - und β -Caseinen [82–87] stattfinden: β -Casein bleibt in Gegenwart von κ -Casein bei höheren Temperaturen in Lösung. Während der Labgerinnung der Milch wird ein Teil des κ -Caseins abgespalten. Nun kann das κ -Casein nicht mehr als Schutzkolloid wirken (siehe Teil II). Die chemischen Bindungen in den Micellen (z. B. Esterbindungen) und das Verhalten der Calcium- und Phosphat-Ionen gegenüber den Micellen untersuchten Schipper [87] und Pyne [89]. Sie fanden, daß kolloidales Calciumphosphat entweder an das Casein adsorbiert oder chemisch gebunden ist.

Schließlich sei bemerkt, daß auch Wechselwirkungen zwischen κ -Casein und anderen Proteinen, z. B. dem β -Lactoglobulin, eintreten [90].

3. Studium einiger Nebenfraktionen

Die α_s -Fraktion, welche die $\alpha_{s1,2}$ -Caseine begleitet, wurde schon in Abschnitt I A 2a erwähnt [88, 91]. Das einzige andere Phosphoprotein sauren Charakters aus dem Caseinkomplex ist das λ -Casein [17] (oder m-Casein [87]), welches oft gemeinsam mit dem κ -Casein vorkommt und auch im α_2 -Casein [26] vorhanden ist. λ -Casein hat einen hohen Phosphorgehalt (1,2 %) (siehe Tabelle 2). Aus dem Caseinkomplex konnten einige Proteine mit einem relativ hohen isoelektrischen Punkt (6,4–8,0) isoliert werden; sie enthalten sehr wenig oder gar keinen Phosphor.

Für Mellanders γ -Casein [13] wurde kürzlich ein neues Reinigungsverfahren ausgearbeitet [32]. Die Aminosäurezusammensetzung ist nur von einem älteren Präparat bekannt [92]. Die Sedimentationskonstante beträgt 1,15 S bei 1,3 °C für eine 1-proz. Lösung in einem Phosphatpuffer vom pH = 7 (0,1 M), das Molekulargewicht ungefähr 30000. Aschaffenburg konnte zwei genetische Varianten nachweisen [35].

Wenn der pH-Wert vom Gesamt-Casein auf 4 gebracht wird, können zwei Proteine durch Zentrifugieren abgetrennt werden, die jedoch zwischen pH 7 und 9 unlöslich sind: das „rote Protein“, ein Metallo-Glykoprotein, welches zur Gruppe der Transferine gehört [93], und ein basisches Protein, das Lactollin [94].

Zum Schluß sei noch bemerkt, daß einige Enzyme, z. B. Protease und Lipase, fest an das Casein gebunden sind [95].

- [82] J. Garnier, J. Yon u. G. Mocquot, Biochim. biophysica Acta 82, 481 (1964).
- [83] U. S. Ashworth, J. Dairy Sci. 47, 351 (1964).
- [84] D. F. Waugh, J. physic. Chem. 65, 1793 (1961).
- [85] D. F. Waugh, M. Ludwig, P. Dreizen u. R. Noble, Abstr. Papers internat. Congr. Biophysics, Stockholm 1961, S. 196.
- [86] W. Manson in [53], S. 513.
- [87] L. J. Schipper, Dissertation, Landwirtschaftliche Hochschule Wageningen, 1961.
- [88] D. F. Waugh, M. L. Ludwig, J. M. Gillespie, B. Melton, M. Foley u. E. S. Kleiner, J. Amer. chem. Soc. 84, 4929 (1962).
- [89] G. T. Pyne, J. Dairy Res. 29, 101 (1962).
- [90] H. Tessier u. D. Rose, J. Dairy Sci. 47, 1047 (1964).
- [91] B. Ribadeau-Dumas, J. L. Maubois, G. Mocquot u. J. Garnier, Biochim. biophysica Acta 82, 494 (1964).
- [92] W. G. Gordon, W. F. Semmnett u. M. Bender, J. Amer. chem. Soc. 75, 1678 (1953).
- [93] M. L. Groves, J. Amer. chem. Soc. 82, 3345 (1960).
- [94] M. L. Groves, J. J. Basch u. W. G. Gordon, Biochemistry 2, 814 (1963).
- [95] R. C. Warner u. R. Pollis, J. Amer. chem. Soc. 67, 529 (1945).

Alle Nebenfraktionen aus dem Casein-Komplex mit einem relativ hohen isoelektrischen Punkt gehören eigentlich nicht zu den Caseinen, da sie wahrscheinlich nicht in der Milchdrüse synthetisiert werden.

B. Schaf- und Ziegenmilch-Caseine. Das Casein der Muttermilch

Während das Kuhmilch-Casein und seine Fraktionen intensiv untersucht worden sind, fehlen entsprechende Angaben für andere Caseine fast vollständig [97–99]. Hier sei auf eine Arbeit von Sloan et al. [96] hingewiesen, die Caseine von vierzig Tieren (acht Arten), aber nur elektrophoretisch, verglichen und drei Typen von Elektropherogrammen erhielten.

Wie Alais und Jollès [73, 99] zeigten, enthalten Schaf-, Ziegen- und Muttermilch-Caseine Galaktose und Galaktosamin. Während im Muttermilch-Casein nur N-Acetylneuraminsäure gefunden wurde (0,80 % [99]) oder 2,1 % [100]), ist in den Schaf- bzw. Ziegenmilch-Caseinen ein Gemisch von N-Acetyl- und N-Glykolyneuraminsäuren vorhanden [73] (0,09 bzw. 0,13 %).

Da die Labgerinnung der Schafmilch ähnlich wie diejenige der Kuhmilch verläuft (siehe Teil II), wurde das Vorhandensein einer „ κ -ähnlichen“ Fraktion vermutet. Alais und Jollès [98] versuchten, sie zu isolieren, und erhielten ein Casein, das in Gegenwart von 0,4 M CaCl₂ löslich blieb und von Lab ohne Zusatz von Ca²⁺ angegriffen wurde.

Daß das menschliche Casein aus sehr vielen Fraktionen besteht, konnten Malpress [100] sowie Alais und Jollès [101] elektrophoretisch mit harnstoffhaltigen Puffern zeigen. Nicht jedesmal konnten Präparate erhalten werden, die mit Lab verdaut werden konnten [99]. Malpress und Seid-Akhavan [102] konnten kürzlich durch Chromatographie auf CM-C50 Sephadex mit harnstoffhaltigen Puffern eine Fraktion isolieren, die dieselben Eigenschaften wie Kuhmilch- κ -Casein hat.

Schließlich sei bemerkt, daß das menschliche Casein keine konstanten Eigenschaften und keine konstante Zusammensetzung zu haben scheint. Sie werden sowohl durch die Zusammensetzung der Milch beeinflußt, aus der es gewonnen wurde, als auch durch die Änderungen in der Aktivität gewisser Enzyme (z. B. proteinsynthetisierender Enzyme) der Zellen, in denen sich die Milch bildet [103]. Das menschliche Casein enthält eine in Alkohol lösliche Fraktion (25 % des Gesamtgewichtes;

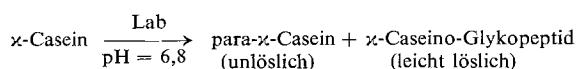
- [96] R. E. Sloan, R. Jenness, A. L. Kenyon u. E. A. Regehr, Comparat. Biochem. Physiol. 4, 47 (1961).
- [97] H. Höller, Milchwissenschaft 17, 485 (1962).
- [98] C. Alais u. P. Jollès, Abstr. 6th internat. Congress Biochem., New York (1964).
- [99] C. Alais u. P. Jollès, Nature (London) 196, 1098 (1962).
- [100] F. H. Malpress, Biochem. J. 85, 33 P (1962).
- [101] C. Alais u. P. Jollès, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 255, 2309 (1962).
- [102] F. H. Malpress u. M. Seid-Akhavan, Vortrag auf dem internat. Circle of Dairy Research Leaders, Meeting on Caseins, Jouy-en-Josas (1965).
- [103] F. H. Malpress u. F. E. Hytten, Biochem. J. 91, 130 (1964).

nur 5 % beim Kuhmilch-Casein), welche durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose in fünf Fraktionen aufgeteilt werden konnte^[104]. Bei der alkohollöslichen Fraktion handelt es sich hauptsächlich um Lipide.

II. Die Labgerinnung der Milch

In der Natur kommen zwei Gerinnungsprozesse vor, derjenige des Blutes mit der Spaltung einer Arginyl-Glycin-Bindung, und derjenige der Milch. Hammarsten^[7] stellte fest, daß das Lab (Rennin) ein Enzym ist („Labferment“)^[105–108], und daß bei der Behandlung des Caseins mit Lab peptidähnliche Substanzen freigesetzt werden (NPN, Nicht-Protein-Stickstoff enthaltende Substanzen, z. B. Peptide). Heute wird angenommen, daß die „Labung“ des Caseins drei Reaktionen umfaßt^[109, 110]: Zunächst wird ein Glyko-Makropeptid (Caseino-Glykopeptid^[111]) abgespalten, dann findet die Koagulation statt, und schließlich werden alle Casein-Komponenten langsam durch das Lab in kleinere Peptide zerlegt^[112].

Das Substrat für die Primärreaktion ist nach Waugh^[15] das α -Casein, welches die kolloide Dispersion des Calcium-Caseinates stabilisiert. Diese Annahme haben Jollès und Alais^[113] sowie fast gleichzeitig Nitschmann^[114] bewiesen: Sie fanden, daß man aus der mit Lab behandelten Lösung von α -Casein das gleiche Caseino-Glykopeptid wie aus Lösungen von Gesamt-Casein oder α -Casein isolieren kann. α -Casein liefert nach der Einwirkung von Lab einen besonders hohen Prozentsatz an trichloressigsäurelöslichem „Nicht-Protein-Stickstoff“ (NPN)^[115]. Die Primärreaktion kann schematisch folgendermaßen dargestellt werden:



Wir werden zuerst über das Lab und die Struktur des α -Caseins sowie des para- α -Caseins berichten und uns dann eingehend mit dem Caseino-Glykopeptid beschäftigen.

[104] C. Alais u. P. Jollès, unveröffentlicht.

[105] K. Linderstrøm-Lang, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 17, Nr. 9 (1929).

[106] C. Porcher, Lait 9, 449, 681, 795 (1929).

[107] H. Holter, Biochem. Z. 255, 160 (1932).

[108] H. Nitschmann u. W. Lehmann, Helv. chim. Acta 30, 804 (1947).

[109] H. Nitschmann u. P. Zahler, Helv. chim. Acta 33, 854 (1950).

[110] H. Mattenheimer, H. Nitschmann u. P. Zahler, Helv. chim. Acta 35, 1970 (1952).

[111] P. Jollès, C. Alais u. J. Jollès, Biochem. biophysica Acta 51, 309 (1961).

[112] C. Alais, G. Mocquot, H. Nitschmann u. P. Zahler, Helv. chim. Acta 36, 1955 (1953).

[113] P. Jollès u. C. Alais, Biochim. biophysica Acta 34, 565 (1959).

[114] H. Nitschmann u. R. Henzi, Helv. chim. Acta 42, 1985 (1959).

[115] R. G. Wake, Austral. J. biol. Sci. 12, 479 (1959).

A. Primärreaktion

1. Das Lab

Das Lab ist ein von Berridge^[116] erstmals gereinigtes und kristallisiertes Enzym, welches im vierten Magen des Kalbes vorkommt. Seine Spezifität ist ähnlich der des Pepsins, jedoch liegt sein pH-Optimum weit höher, bei 4^[117]. Das Lab greift nicht nur das Casein an, sondern auch andere Proteine wie Hämoglobin^[116] oder die B-Kette des oxidierten Insulins^[118]. Neuere Arbeiten über das Lab verdanken wir Foltmann^[119, 120].

2. Das α -Casein

Es wird heute angenommen, daß das α -Casein ein Molekulargewicht von 19000 ± 1000 ^[57, 59, 67] und ein einheitliches Peptid-Grundgerüst hat (165 ± 5 Aminosäurereste). Einige wenige Änderungen sind auf die genetischen Varianten zurückzuführen; diese sowie der Zuckeranteil verursachen letzten Endes die elektrophoretisch beobachtete Heterogenität. Die N-terminalen Aminosäuren sind noch nicht beschrieben worden; mit Carboxypeptidase konnten Jollès et al.^[72] vom C-terminalen Ende her vor allem Valin, aber auch Alanin, Threonin und Serin freisetzen. In Schema 1 haben wir einige Angaben über die Struktur des α -Caseins zusammengefaßt^[67, 121, 122, 132], die hauptsächlich am para- α -Casein sowie am α -Caseino-Glykopeptid gewonnen wurden. Die ersten Ergebnisse des Studiums der tryptischen Einheiten^[67] stehen im Einklang mit Schema 1. Die Labgerinnung findet auch nach Einwirkung von Neuraminidase auf α -Casein statt^[62], selbst wenn anschließend 50 % der Galaktose oxidiert werden^[67]. Der Zuckeranteil ist für die Wirkung des Labes nicht nötig: kürzlich wurde auch aus einem reduzierten α -Casein (S-Carboxymethyl- α -Casein) durch Chromatographie eine zuckerlose Fraktion erhalten^[123], die ebenfalls mit Lab verdaut werden kann. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob das erhaltene lösliche Peptid mit dem „normalen“ Caseino-Glykopeptid identisch ist.

3. para- α -Casein

Das para- α -Casein ist die unlösliche Fraktion, die durch Labeinwirkung auf α -Casein entsteht. Es enthält alle aromatischen Aminosäuren sowie alle Arginin- und Cystin-Reste des α -Caseins (siehe Schema 1), jedoch ist

[116] N. J. Berridge, Biochem. J. 39, 179 (1945).

[117] F. A. Bovey u. S. S. Yanari in: The Enzymes. Academic Press, New York 1960, 2. Aufl., Bd. 4, S. 91.

[118] J. C. Fish, Nature (London) 180, 345 (1957).

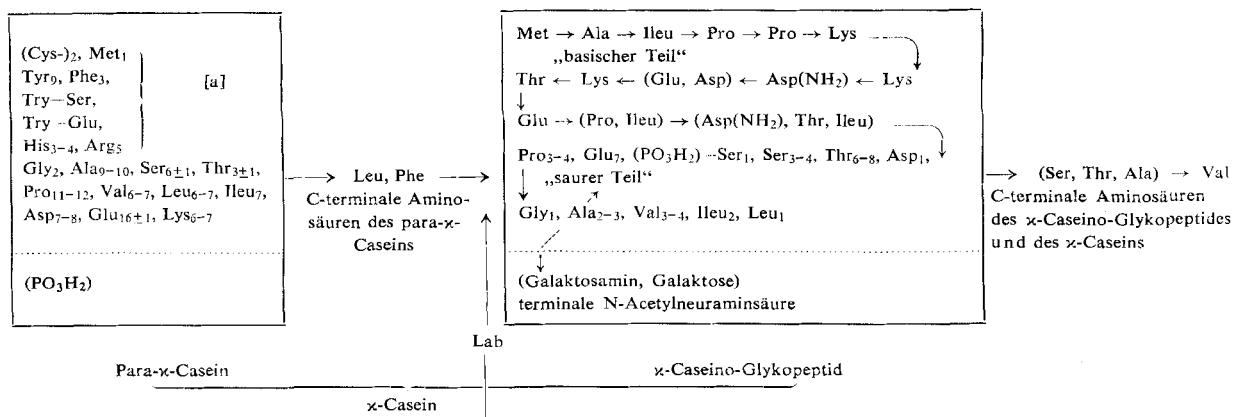
[119] B. Foltmann, Acta chem. scand. 17, 872 (1963); C. R. Trav. Lab. Carlsberg 35, 143 (1966).

[120] B. Foltmann u. B. S. Hartley, Vortrag auf dem internat. Circle of Dairy Research Leaders, Meeting on Caseins, Jouy-en-Josas (1965).

[121] P. Jollès, C. Alais u. J. Jollès, Biochim. biophysica Acta 69, 511 (1963).

[122] A. Delfour, J. Jollès, C. Alais u. P. Jollès, Biochem. biophysic. Res. Commun. 19, 452 (1965).

[123] A. G. Mackinlay u. R. G. Wake, Biochim. biophysica Acta 104, 167 (1965).



Schema 1. Zusammensetzung des Kuhmilch- κ -Caseins (Molekulargewicht 19000 ± 1000): Spaltung durch Lab in para- κ -Casein und κ -Caseino-Glykopeptid.

[a] Hier sind sämtliche aromatische und basische Aminosäuren (mit Ausnahme des Lysins) sowie alles Cystein des κ -Caseins vereinigt [67, 72, 121, 122, 132].

der Zuckergehalt sehr niedrig. Die Aminosäurezusammensetzung sowie die endständigen Aminosäuren wurden erstmals von Jollès et al. [72, 121] angegeben, die auch feststellten, daß die Summe der Aminosäurereste, die sich im para- κ -Casein und im κ -Caseino-Glykopeptid befinden, die Anzahl der Aminosäuren im κ -Casein ergibt. Kalan und Woychik [57] haben neuerdings das para- κ -Casein analysiert. Wie beim κ -Casein konnte auch hier bis jetzt keine N-terminale Sequenz charakterisiert werden; durch Abbau mit Carboxypeptidase wurde ein C-terminaler Phenylalanin-Rest (neben etwas Leucin) identifiziert [121], was Dennis und Wake bestätigten [124]. Casein wird nicht nur von Lab, sondern auch von anderen Enzymen wie Pepsin [125], Chymotrypsin [124] und Kallikrein [126] sowie chemisch (Alkali, Reduktion) angegriffen [67, 121]: man erhält einen unlöslichen „para- κ -casein-ähnlichen“ Teil mit gewöhnlich (aber nicht immer) Phenylalanin (neben etwas Leucin) am C-terminalen Ende [67].

4. κ -Caseino-Glykopeptid (aus Kuhmilch- κ -Casein)

Herstellung und Molekulargewicht. Nach kurzer Einwirkung des Labes auf κ -Casein konnten im löslichen Überstand durch Papierelektrophorese vier Fraktionen nachgewiesen werden [127, 128]: das Caseino-Glykopeptid macht 80 % dieser löslichen Substanzen aus, eine der anderen Fraktionen (10 %) ist wahrscheinlich ein Abbauprodukt. Das Caseino-Glykopeptid kann entweder aus dem Trichloressigsäurefiltrat des mit Lab behandelten Caseins oder durch Chromatographie des löslichen Überstandes auf DEAE-Cellulose isoliert werden [111, 114, 128]: es ist sehr leicht löslich, selbst in 12-proz. Trichloressigsäure, und dialysiert nicht. Elektrophoresen und Ultrazentrifugationen haben gezeigt, daß

[124] E. S. Dennis u. R. G. Wake, Biochim. biophysica Acta 97, 159 (1965).

[125] W. Habermann, H. Mattenheimer, H. Sky-Peck u. H. Sino-hara, Chimia 15, 339 (1961).

[126] P. Jollès, C. Alais u. J. Jollès, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 256, 4308 (1963).

[127] J. Blondel-Quéroix u. C. Alais, Bull. Soc. Chim. biol. 46, 963 (1964).

[128] C. Alais, J. Blondel-Quéroix u. P. Jollès, Bull. Soc. Chim. biol. 46, 973 (1964).

es sich um eine einheitliche Substanz handelt (Molekulargewicht etwa 7500 ± 500 [129]).

Aminosäurezusammensetzung. Besonders hervorzuheben ist der hohe Gehalt an Hydroxyaminoäuren, Glutaminsäure und Prolin sowie die Abwesenheit von aromatischen Aminosäuren, von Cystin, Histidin und Arginin [57, 111, 113, 130–132]. Ein Methioninrest wurde erst kürzlich identifiziert [122]. Der Peptidanteil des Caseino-Glykopeptides beträgt ungefähr 65 %, der P-Gehalt 0,37 % (Phosphoserinrest [73]).

Zuckerzusammensetzung. Es konnten Galaktosamin, Galaktose und N-Acetylneuraminsäure nachgewiesen werden [73, 129, 133], und zwar 75, 68 bzw. 77 % ihres Gehaltes im κ -Casein; einige Autoren sprechen sogar von 100 % der N-Acetylneuraminsäure [62, 64]. Der Zuckeranteil des κ -Caseino-Glykopeptides beträgt ungefähr 30 %. (Wie bei vielen anderen zuckerreichen Substanzen ist auch hier ein Teil nicht erfaßt, wofür wahrscheinlich die angewendeten Methoden verantwortlich sind.)

Strukturstudien. Jollès und Mitarbeiter [111] konnten durch chemische und enzymatische Methoden zeigen, daß im κ -Caseino-Glykopeptid ein Methioninrest als N-terminale Aminosäure vorliegt [122], dem ein Alaninrest folgt. Die C-terminale Sequenz gleicht derjenigen des κ -Caseins [72] [(Ser, Thr, Ala)-Val]; so ist anzunehmen, daß das κ -Caseino-Glykopeptid im C-terminalen Teil des κ -Caseins liegt. Die Struktur des N-terminalen Octadecapeptides wurde durch Abbau mit Trypsin und Chymotrypsin aufgeklärt [132] (siehe Schema 1).

Versuche mit Neuraminidase (*V. cholerae*) haben gezeigt, daß die N-Acetylneuraminsäure endständig im Zuckerteil vorliegt [73, 134]; partielle Hydrolysen mit

[129] H. Nitschmann, H. Wissmann u. R. Henzi, Chimia 11, 76 (1957).

[130] H. Nitschmann u. R. Beeby, Chimia 14, 318 (1960).

[131] A. Delfour, J. Jollès, C. Alais u. P. Jollès, Abstr. Meeting Fed. European Biochem. Soc., Wien 1965. Verlag der medizinischen Akademie, Wien 1965, S. 211.

[132] A. Delfour, C. Alais u. P. Jollès, Chimia 20, 148 (1966).

[133] J. R. Brunner u. M. P. Thompson, J. Dairy Sci. 42, 1881 (1959).

[134] P. Jollès, C. Alais, A. Adam, A. Delfour u. J. Jollès, Chimia 18, 357 (1964).

H_2SO_4 führten zur Vermutung, daß nicht Galaktose, sondern Galaktosamin direkt an den Peptidteil gebunden ist^[134] (wahrscheinlich, aber wohl nicht ausschließlich, N-glykosidisch).

Abschließend sei auf ein in manchen Punkten ähnliches, jedoch kürzeres Glykopeptid aus dem Kuh-Kolostrum hingewiesen^[135].

5. Die vom Lab im α -Casein gespaltene Bindung

Wie schon berichtet, konnten wir nach Einwirkung des Labes auf α -Casein keine neuen N-terminalen Aminosäuren beim para- α -Casein feststellen^[72], wohl aber beim Caseino-Glykopeptid (Methionin)^[122]; auch eine neue C-terminale Aminosäure (Phenylalanin), die vom para- α -Casein stammt, konnte identifiziert werden^[121]. Kann man unter diesen Umständen von der Spaltung einer Phe-Met-Bindung sprechen?

Garnier et al.^[137] verfolgten die Bildung des Caseino-Glykopeptides durch Titrieren der freigesetzten Carboxygruppen bei konstantem pH-Wert und fanden, daß eine Carboxygruppe pro 55000 Molekulargewichtseinheiten freigesetzt wird (das Molekulargewicht des α -Caseins wird heute zu 19000 ± 1000 angenommen). Diese und auch die folgenden Betrachtungen sprechen für die Spaltung einer Esterbindung. Jollès et al.^[121] reduzierten nämlich das α -Casein mit LiBH₄, was eine Spaltung zur Folge hatte. Sie wiesen im unlöslichen para- α -casein-ähnlichen Teil einen 2-Amino-3-phenyl-1-propanol-(Phenylalaninol)-Rest nach, was auch für eine Esterbindung zwischen dem C-terminalen Phenylalanin und einem hydroxygruppenhaltigen Rest (von einem Zucker, Serin oder Threonin) spricht, jedoch mit dem Vorbehalt, daß dieser Phenylalanin-Rest keine andere labile Bindung eingegangen ist (z. B. eine sehr labile Peptidbindung).

geht. Anschließend setzt das Lab aus dem gelösten Material das Glykopeptid frei.

Schließlich haben Dennis und Wake^[124] gezeigt, daß ein zuckerfreies, reduziertes α -Casein durch Lab gespalten wird, was eine Esterbindung zwischen Phenylalanin und einem Zucker ausschließt.

Weitere Forschungen sind nötig, um die Frage der durch die Labeinwirkung gespaltenen Bindung (eventuell Phe-Met-Bindung wie in Schema 1 gezeigt) zu klären (ältere Hypothesen siehe^[39a, 136]).

6. Caseino-Glykopeptide aus Gesamt-Schaf-, Ziegen- und -Muttermilch

Aus Gesamt-, α - und β -Kuhmilch-Casein kann man das gleiche Caseino-Glykopeptid darstellen^[113]. Da α -Fraktionen aus Schaf-, Ziegen- und Muttermilch noch nicht rein isoliert wurden, verwendeten Jollès und Alais^[99, 111] die Gesamt-Caseine, um Caseino-Glykopeptide zu gewinnen.

Reinigung. Die Caseino-Glykopeptide wurden aus dem Trichloressigsäurefiltrat der mit Lab behandelten Caseine isoliert^[111]; aus menschlichem Gesamt-Casein konnte nicht jedesmal ein Glykopeptid gewonnen werden^[99].

Aminosäurezusammensetzung. Die drei neuen Caseino-Glykopeptide enthalten viel Serin, Threonin, Glutaminsäure und Prolin; aromatische Aminosäuren, Cystin und Arginin fehlen^[111]. Diese Zusammensetzung scheint charakteristisch für Caseino-Glykopeptide zu sein. Ihr Peptidanteil beträgt ungefähr 80 %^[73].

Tabelle 3. Angaben zur Struktur des Schaf-Caseino-Glykopeptids [122, 132, 140].

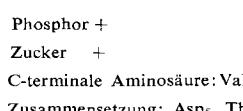
1. N-terminale Sequenz mit den drei Lysinresten des Moleküls:



2. Decapeptid mit dem einzigen Histidinrest des Moleküls:



3. „Saurer“ Teil:



Cheeseman et al.^[138] waren mit dieser „Ester“-Hypothese nicht einverstanden, da sie keine Protonenfreisetzung während der Einwirkung des Labes beobachten konnten. Beeby und Nitschmann^[139] nahmen an, daß das Lab zuerst Bindungen in der Art von Wasserstoffbrücken spaltet, wobei ein Teil des α -Caseins in Lösung

[135] R. Kuhn u. D. Ekong, Chem. Ber. 96, 683 (1963).

[136] H. Nitschmann u. R. Varin, Helv. chim. Acta 34, 1421 (1951).

[137] J. Garnier, G. Mocquot u. G. Brignon, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 254, 372 (1962).

[138] G. C. Cheeseman, M. Rawitscher u. J. M. Sturtevant, Biochim. biophysica Acta 69, 169 (1963).

[139] R. Beeby u. H. Nitschmann, J. Dairy Res. 30, 7 (1963).

Zuckerzusammensetzung. Der Zuckeranteil der Schaf-, Ziegen- und Muttermilch-Caseino-Glykopeptide beträgt 7,1; 11,6 bzw. 16 %^[73, 99]. In allen drei Substanzen kommen Galaktosamin und Galaktose vor; die Schaf- und Ziegen-Glykopeptide enthalten ein Gemisch von N-Acetyl- und N-Glykoylneuraminsäuren, das menschliche Glykopeptid nur N-Acetylneuraminsäure; nur in letzterem Glykopeptid wurden Fucose und Glucosamin gefunden^[102].

C- und N-terminale Aminosäuren. Nach Einwirkung von Carboxypeptidase auf Schaf-, Ziegen- und Muttermilch-Caseino-Glykopeptide wurde Valin freigesetzt^[99, 111]. Die N-terminale Aminosäure wurde nur

beim Schaf-Caseino-Glykopeptid untersucht: wie beim Kuh- α -Caseino-Glykopeptid handelt es sich um Methionin^[122].

Struktur. Das Caseino-Glykopeptid aus Gesamt-Schafmilch-Casein besteht aus drei Teilen: 1. einer N-terminalen Sequenz, welche die drei Lysinreste des Peptides enthält; 2. einem Decapeptid mit dem einzigen Histidinrest des Peptides; 3. einem „sauren“ Teil, der durch Säulenchromatographie noch nicht ganz gereinigt werden konnte. Er enthält den Phosphor und den größten Teil der Zucker^[122, 132, 140] (siehe Tabelle 3).

Bei Schaf- und Ziegen-Caseino-Glykopeptiden liegen die Neuraminsäuren endständig vor; Galaktosamin, aber nicht Galaktose, scheint direkt an die Peptidkette gebunden zu sein^[134]. Die Anwesenheit von O-glykosidischen Bindungen zwischen den Zuckern und Serin sowie Threonin vermutet Malpress^[102].

7. „Caseino-Glykopeptid-ähnliche“ Substanzen

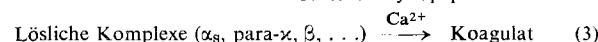
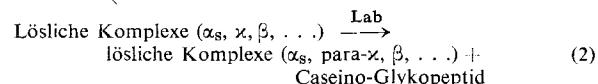
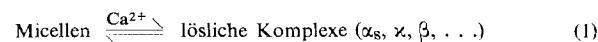
Wie schon in Abschnitt II A 3 kurz berichtet wurde, wird Casein nicht nur von Lab, sondern auch von anderen Enzymen^[125, 126] oder chemisch angegriffen^[67, 121]. Bei der Primärreaktion von Kuhmilch-Casein mit Pepsin wird das gleiche^[125], mit Kallikrein ein etwas anderes^[126] Peptid wie mit Lab abgespalten. Ein etwas anderes Peptid erhält man auch in guter Ausbeute mit NaOH (0,1 N, 20 °C)^[67] und durch Reduktion^[121]. Alle diese Caseino-Glykopeptid-ähnlichen Substanzen sind, wie das durch Lab gewonnene Glykopeptid, in 12-proz. Trichloressigsäure löslich und dialysieren nicht; aromatische Aminosäuren und Arginin sind nicht vorhanden. Durch Erhitzen des Caseins auf 100 °C wird nicht nur Neuraminsäure, sondern es werden auch „Caseino-Glykopeptid-ähnliche“ Substanzen freigesetzt^[104, 141, 142] (Hitzeinwirkung auf Casein siehe auch^[142, 143]).

B. Sekundäre und tertiäre Reaktionen

Die zweite Phase der Milchgerinnung umfaßt mehrere Reaktionen (Desaggregation, Reaggregation, Koagulation, Synärese des Gels), bei denen sich der Dispersionsgrad der Caseinmicellen ändert. Dabei ist die Koagulation am leichtesten physikalisch zu verfolgen (Ultramikroskop^[144], Ultraschall^[145], Viscosimetrie^[146]). Die Koagulation der Milch kann durch fol-

- [140] A. Delfour, Dissertation, Universität Paris, 1965.
- [141] P. J. de Koning, R. Jenness u. H. P. Wignaud, Nedcrl. Melk- en Zuiveltijdschr. 17, 352 (1963).
- [142] N. Kiger, C. Alais u. P. Jollès, Vortrag auf dem 3. Meeting Fed. European Biochem. Soc., Warschau (1966).
- [143] D. T. Davies u. J. C. D. White, Vortrag auf dem internat. Circle of Dairy Research Leaders, Meeting on Caseins, Jouy-en-Josas (1965).
- [144] K. Imhof u. H. Hostettler, Schweiz. Milchztg. 82, 281, 289 (1956).
- [145] A. Swiatek u. F. Kuczera in [53], S. 562.
- [146] W. G. Godbey u. C. W. Gehrke, J. Dairy Sci. 44, 1163 (1961).

gende Reaktionen schematisch dargestellt werden^[147] (siehe auch Abschnitt I A 2c):



Es wird angenommen, daß sich das Gleichgewicht (1) sehr schnell einstellt und den Ablauf von Reaktion (2) nicht stört. In Abwesenheit von Ca^{2+} findet nur Reaktion (2) statt; es tritt keine Koagulation ein. Die Geschwindigkeit der Reaktion (3) nimmt mit steigender Temperatur stark zu; dies erlaubt, sie bei niedriger Temperatur von Reaktion (2) zu unterscheiden^[148].

Cheeseman^[149] konnte zeigen, daß gewisse Substanzen die Koagulationszeit verkürzen oder verlängern können (z. B. Ca^{2+} verkürzt, Harnstoff verlängert die Koagulationszeit). Nach der Koagulation wird die Synärese des Caseingels vollendet. Man kann diese Reaktion durch die Gewichtsänderung des Gels oder auch durch die Messung der austretenden Flüssigkeit verfolgen^[149]. Die Synärese beginnt schon während der Hydrolyse des α -Caseins (nach Gleichung (2)). Zuerst bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen den Casein-Aggregaten und zum Schluß auch Brücken zwischen Thiolgruppen^[149, 150]. Die Geschwindigkeiten der zweiten Phase und der Labgerinnung wurden neuerdings von Mayknecht^[151] sowie Scott Blair et al.^[152] untersucht.

Die Existenz einer tertiären Reaktion zeigten Alais et al.^[112]. Während der Primärreaktion findet eine spezifische Verdauung des Caseins durch das Lab statt, während der tertiären Reaktion eine unspezifische Verdauung. Zuerst entstehen hochmolekulare Substanzen, die von den verschiedenen Casein-Komponenten stammen; zum Schluß erhält man eine große Anzahl von Polypeptiden, die mehr oder weniger resistent gegenüber dem Lab sind.

Abschließend sei noch bemerkt, daß man bei der Verdauung des Caseins mit verschiedenen Enzymen, besonders Pepsin, oft sehr ähnliche Substanzen wie bei der tertiären Reaktion der Labgerinnung erhält^[31, 153–157].

Eingegangen am 9. April 1965, ergänzt am 11. März 1966 [A 522]

[147] J. Garnier, Biochim. biophysica Acta 66, 366 (1963).

[148] J. Garnier u. R. Chevalier, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 252, 350 (1961).

[149] G. C. Cheeseman in [53], S. 465.

[150] R. Schober, W. Christ u. I. Prinz, Milchwissenschaft 16, 81 (1961).

[151] E. A. M. Mayknecht in [53], S. 601.

[152] G. W. Scott Blair u. J. C. Oosthuizen, J. Dairy Res. 28, 165 (1961); 29, 37 (1962).

[153] B. Lindqvist u. T. Storgards, Acta chem. scand. 14, 1432 (1960).

[154] P. Baudet, R. Rössler u. E. Cherbuliez, Helv. chim. Acta 43, 1795 (1960).

[155] L. Strid, Acta chem. scand. 15, 1423 (1961).

[156] J. Schormüller u. R. Fresenius, Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. 114, 279 (1961).

[157] M. Derechin, Biochem. J. 82, 42 (1962).