

**Trocknung:** Einhängen in einen Heissluftofen bei 60°.

**Nachweis:** Zum Nachweis der Chromatogramme wurde mit einer 0,1-m. wässrigen Lösung von Violursäure bestäubt. Die Farben sind nach dem Trocknen des Chromatogramms in einem Heissluftofen bei 60° sehr deutlich, beginnen aber nach etwa 10 Tagen leicht zu verblassen, da sich auch der Hintergrund verfärbt.

**Resultate:** Die Rf-Werte und die Farben der Violurat-Flecken der Alkali- und Erdalkali-Ionen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Chromatogramme der Trennungsversuche sind in Figur 1 für die Alkali-Ionen, in Figur 2 für die Erdalkali-Ionen und in Figur 3 für die Gruppe der biologisch wichtigen Ionen K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> und Mg<sup>++</sup> wiedergegeben.

Über den Umfang, in dem diese Trennungen quantitativ ausgewertet werden können, werden wir später berichten.

### Zusammenfassung.

Die Ionen der Alkali- und der Erdalkali-Gruppe wurden als Acetate mit einem Gemisch von Äthylalkohol-Essigsäure aufsteigend chromatographiert. Die getrennten Ionen können in unterschiedlich gefärbte Violurate übergeführt werden. Es werden die Rf-Werte für Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Be<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Sr<sup>+</sup>, Ba<sup>++</sup> ermittelt.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.

## 175. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch IV<sup>1)</sup>.

### Die Proteolyse des Caseins durch kristallisiertes Lab.

von Hs. Nitschmann und R. Varin.

(8. VI. 51.)

#### 1. Einleitung.

Das Labferment ist bisher meist als Proteinase angesehen worden. Allerdings ist sein Substrat bei der Milchgerinnung ein Protein, nämlich das Casein. Aber ein zwingender Beweis dafür, dass Lab Casein wirklich proteolytisch abbaut, ist bisher nicht erbracht worden. Noch viel weniger wissen wir, ob die Primärreaktion der Milchlabung, die der Gerinnung vorausgeht, ein proteolytischer Eingriff ist.

Die Tatsache, dass verschiedene bekannte Proteinasen (z. B. Pepsin, Chymotrypsin, Papain) die Fähigkeit haben, Milch zum Koagulieren zu bringen, ist natürlich kein Beweis dafür, dass die Labgerinnung durch eine Proteolyse eingeleitet wird. Wir wissen ja heute, dass diese Fermente nicht absolut spezifisch nur Peptidbindungen spalten, sondern unter Umständen auch gegenüber anderen Bindungen eine gewisse hydrolytische Aktivität besitzen.

Gewichtiger sind zahlreiche, z. T. weit zurückliegende Beobachtungen, nach denen in Milch oder Caseinlösungen unter der Wirkung von Lab die Menge der durch isoelektrisches pH, Trichloressigsäure o. a. nicht fällbaren N-Verbindungen zunimmt. Alle diese Beobachtungen, an deren Richtigkeit nicht zu zweifeln ist, werden als strenge Beweise

<sup>1)</sup> Nr. III der Reihe siehe Helv. 33, 854 (1950).

für eine proteolytische Aktivität des Labes durch folgende Feststellungen in Frage gestellt:

1. Sie wurden ohne Ausnahme mit nicht kristallisierten Labpräparaten ausgeführt, für deren Freiheit von anderen Fermenten keine absolute Gewähr besteht.

2. Die Substrate enthielten wahrscheinlich alle mehr oder weniger des proteolytischen Fermentes, das sich normalerweise immer in der rohen Milch findet, bei der Isolierung des Caseins mit diesem zusammen ausgefällt wird und sich deshalb in allen Caseinpräparaten findet<sup>1).</sup>

3. Zunahme des löslichen Stickstoffs beweist nur irgendeinen Abbau, der aber nicht notwendigerweise ein proteolytischer sein muss. Es kann sich u. U. sogar nur um die Spaltung von Aggregaten und Komplexen (Beeinflussung der „interactions“) handeln. Auf diese Weise dürfte wahrscheinlich die Hammarsten'sche Molkenalbumose in Freiheit gesetzt werden<sup>2).</sup>

*H. Holter*<sup>3)</sup> sorgfältige Versuche zum titrimetrischen Nachweis eines proteolytischen Abbaues des Caseins durch Lab konnten die Frage auch nicht entscheiden. Er fand zwar eine knapp die Fehlergrenze der Methode überschreitende Zunahme der basischen Gruppen. Doch auch ihm stand kein kristallisiertes Lab zur Verfügung.

Es scheint, dass der einzige Versuch, die proteolytische Aktivität bei kristallisiertem Lab nachzuweisen, derjenige von *Berridge*<sup>4)</sup> mit Hämoglobin als Substrat ist. Dieser Autor hat ebenfalls nur die Zunahme des mit Trichloressigsäure Nichtfällbaren bestimmt.

Erfolgreiche Spaltungsversuche an Peptiden sind nie mitgeteilt worden.

Dagegen haben *H. Holter & Si-Oh Li*<sup>5)</sup> ganz kürzlich festgestellt, dass Lab — wie auch Pepsin und Chymotrypsin — imstande ist, N-(p-Chlorphenyl)-amidophosphorsäure zu spalten (Phosphamidasewirkung).

Wir sind also über die Leistungsfähigkeit des Labes sehr mangelhaft orientiert. Die Erforschung der Primärreaktion dürfte aber erleichtert werden, wenn man einmal wüsste, welches die Möglichkeiten sind, mit denen man zu rechnen hat.

Wir haben deshalb zunächst versucht, den Abbau des Caseins durch sehr grosse Dosen von Lab (kristallisiert) messbar zu machen und wenn möglich bis zu seinem Ende zu treiben. Es wird nachstehend gezeigt, dass das möglich ist und dass dabei titrimetrisch ein beträchtlicher hydrolytischer Abbau festgestellt werden kann<sup>6).</sup>

## I. Zunahme des löslichen Stickstoffs unter der Einwirkung von Lab.

Diese Versuche hatten insbesondere den Zweck, festzustellen, wie gross die Wirksamkeit der Milchproteinase im Verhältnis zu der des Labes ist und wie die Mitwirkung der ersteren beim Caseinabbau am besten ausgeschaltet werden kann.

<sup>1)</sup> *R. C. Warner & E. Polis*, Am. Soc. **67**, 529 (1945).

<sup>2)</sup> *E. Cherbuliez & J. Jeannerat* (Helv. **22**, 959 (1939)) konnten zeigen, dass ihre Fraktion  $\delta$ , die sie aus nicht gelabter Milch isolierten, mit der Molkenalbumose identisch ist.

<sup>3)</sup> *H. Holter*, Biochem. Z. **255**, 160 (1932).

<sup>4)</sup> *N. J. Berridge*, Biochem. J. **39**, 179 (1945).

<sup>5)</sup> *H. Holter & Si-Oh-Li*, Acta Chem. Scand. **4**, 1321 (1951).

<sup>6)</sup> Für eine ausführliche Darstellung der Versuche siehe *R. Varin*, Diss. Bern 1951. Mikrofilmkopien erhältlich bei der Stadt- und Hochschulbibliothek, Bern.

Eine erste orientierende Versuchsreihe wurde mit Magermilch als Substrat und einem Handelslabpräparat (*Marschall*) ausgeführt. Bedingungen: 0,3 L. E.<sup>1)</sup> pro cm<sup>3</sup> (ml), eine Menge, die als normal bezeichnet werden kann, da sie die Milch bei 35° in 5 Minuten gerinnen lässt; Abbautemperatur 20°, Toluol als antibakterieller Zusatz. Sowohl der bei isoelektrischer Fällung (pH 4,6), als auch der bei Trichloressigsäure-Fällung lösliche N stieg während 38 Tagen linear mit der Zeit an. Der Anstieg pro Zeiteinheit war in roher Milch ca. 3mal grösser als in Milch, in der das proteolytische Milchferment durch 10minütiges Erhitzen auf 85° zerstört worden war, d. h. in der rohen Milch war deren eigene Proteinase doppelt so wirksam wie die zugesetzte Labmenge.

Dass auch mehrfach umgefällte Caseinpräparate nicht frei von Milchproteinase sind, zeigten Versuche mit einer 10-proz. Lösung von *Hammarsten*-Casein der Firma *Merck*. In dieser Lösung (hergestellt mit NaOH, End-pH 6,8) stieg bei 35° während 100 Stunden der in Trichloressigsäure lösliche Stickstoff von 2 auf 5% des Gesamtstickstoffes an. Bakterienwachstum war durch Toluolzusatz unterdrückt worden. Eine zuvor auf 85° erhitzte Lösung zeigte unter gleichen Bedingungen keine Zunahme des löslichen N. Große Dosen von kristallisiertem Lab (bis zu 28 L. E. pro cm<sup>3</sup>) liessen in zuvor erhitzzter Caseinlösung den löslichen N um ein vielfaches ansteigen. Da bei der Versuchstemperatur von 35° das Lab aber allmählich inaktiviert wird, soll auf die quantitativen Ergebnisse dieser Versuchsreihen nicht näher eingegangen werden. Sie haben immerhin gezeigt, dass auch kristallisiertes Lab an Casein, das frei von Milchproteinase ist, einen Abbau bewirkt. Welcher Art derselbe ist, darüber sagen diese Versuche noch nichts.

## II. Zunahme der sauren und der basischen Gruppen unter Einwirkung von kristallisiertem Lab.

### 1. Versuche.

Die Ergebnisse der unter I beschriebenen Versuche gestatteten uns, geeignete Bedingungen für die titrimetrische Verfolgung des Caseinabbaues zu wählen.

Um die Inaktivierung des Labes zu vermeiden, wählten wir als Versuchstemperatur 25°, was auch *Holter*<sup>2)</sup> schon empfohlen hat.

Als Substrat benützten wir wieder Lösungen des gleichen Caseins nach *Hammarsten* (*Merck*).

Bei dem für alle Versuche verwendeten Lab handelt es sich um das Präparat, welches *N. J. Berridge*<sup>3)</sup> vor 6 Jahren kristallisiert hat und von dem er uns freundlicherweise einen Teil überliess. Das Präparat war unter der Mutterlauge mit etwas Thymol im Eisschrank aufbewahrt worden und hatte seine Aktivität voll bewahrt.

Wir verzichteten darauf, die Substratlösungen zur Inaktivierung der Milchproteinase zu erhitzen, weil es nicht ausgeschlossen ist, dass die Reaktivität des Caseins durch Wärme verändert wird. Wir arbeiteten dafür mit sehr grossen Labdosen, wodurch es möglich wurde, den ganzen Abbau in Zeiträumen zu studieren, in denen die Milchproteinase überhaupt noch keine merkliche Wirkung entfalten konnte.

Die Titration der sauren Gruppen wurde nach *Willstätter & Waldschmidt-Leitz*<sup>4)</sup> in der Mikromodifikation von *Grassmann & Heyde*<sup>5)</sup> ausgeführt: 0,2 cm<sup>3</sup> Reaktionsgemisch wurden mit 2 cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohol und 2 Tropfen 1-proz. Phenolphthalein versetzt und unter Stickstoff mit einer 0,01-n. Lösung von KOH in 90-proz. Alkohol bis zum Umschlagspunkt (Vergleichslösung!) titriert<sup>6)</sup>. Um nicht nur Peptide, sondern auch freie Amino-

<sup>1)</sup> Lab-Einheiten: Eine Einheit bedeutet in dieser Arbeit diejenige Labmenge, gelöst in 1 cm<sup>3</sup>, die 10 cm<sup>3</sup> frische Magermilchmilch bei 35°C in 100 Sekunden zur Gerinnung bringt (erste Flocken).

<sup>2)</sup> *H. Holter*, Biochem. Z. **255**, 160 (1932).

<sup>3)</sup> *N. J. Berridge*, Biochem. J. **39**, 179 (1945).

<sup>4)</sup> *A. Willstätter & E. Waldschmidt-Leitz*, B. **54**, 2988 (1921).

<sup>5)</sup> *W. Grassmann & W. Heyde*, Z. physiol. Ch. **183**, 32 (1929).

<sup>6)</sup> Wir benützten eine horizontale Mikrobürette mit 1/100 cm<sup>3</sup> Teilung.

säuren quantitativ zu erfassen, müsste nach Willstätter & Waldschmidt-Leitz allerdings in 90-proz. Alkohol titriert werden. Da das aber experimentelle Schwierigkeiten (Ausfällung von Casein, unscharfer Umschlagpunkt) mit sich bringt und ein weitgehender Abbau bis zur Freisetzung von Aminosäuren kaum zu erwarten war, arbeiteten wir in 50-proz. Alkohol. Wir sind uns aber bewusst, dass die Werte für die Zunahme der sauren Gruppen deshalb vielleicht etwas zu klein herausgekommen sind.

Die Titration der basischen Gruppen geschah in ähnlicher Weise mit Naphthylrot (Benzol-azo- $\alpha$ -naphthylamin) und Salzsäure in Aceton, wobei wir uns genau an die Vorschriften von Linderström-Lang<sup>1)</sup> und Holter et al.<sup>2)</sup> hielten. Auf das Abzentrifugieren des Bodenkörpers (Casein ist im sauren Milieu im Aceton unlöslich) zur Erkennung des Umschlagpunktes konnte verzichtet werden, da das ausgefällte Casein sich sehr rasch absetzte.

Wir untersuchten den Abbau in 5-proz. Na-Caseinatlösungen vom pH 6,8 und in 1,7-proz. salzsauren Caseinlösungen vom pH 2,3. Die Ansätze wurden durch Verdünnen 2mal konzentrierter Stammlösungen<sup>3)</sup> mit Enzymlösung und Wasser auf das doppelte Volumen hergestellt. Puffer wurde nicht zugesetzt, so dass also nur das Substrat selber pufferete.

Zuerst überzeugten wir uns, dass in unsern Substratlösungen ohne Labzusatz bei 25° mit Toluol als antibakteriellem Zusatz die Titrationswerte während mindestens 24 Stunden innerhalb der Fehlerbreite tatsächlich konstant blieben. Tabelle 1 und Kurve I in Figur 1 zeigen die Werte für saure Gruppen bei pH 6,8. Ein analoger Kontrollversuch wurde bei pH 2,3 gemacht.

Tabelle 1.

t	0	0,25	0,83	1,16	1,83	4,16	6,00	23,00
a	0,38	0,37	0,38	0,37	0,39	0,36	0,38	0,36
a - a <sub>0</sub>	0	-0,01	0	-0,01	+0,01	-0,02	0	-0,02

t = Zeit in Stunden.

a = Titrationswert: cm<sup>3</sup> 0,01-n. KOH für 0,2 cm<sup>3</sup> Substrat = Milliäquivalente saure Gruppen pro g Casein.

a - a<sub>0</sub> = Veränderung des Titrationswertes, Umsatz.

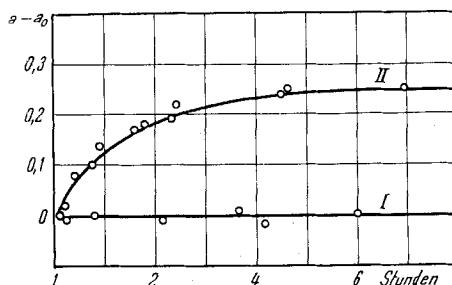


Fig. 1.

Die Fehlerbreite ergibt sich aus Zeile 3 zu  $\pm 0,02$  Milliäquivalente saure Gruppen pro Gramm Casein; das sind ca. 6–8% des maximal festgestellten Umsatzes (siehe weiter unten).

Von zahlreichen Abbauversuchen sollen nur für einen (Versuch Nr. 7) die detaillierten Daten (Titration der sauren Gruppen) mitgeteilt werden (Tab. 2, Fig. 1, Kurve II).

<sup>1)</sup> K. Linderström-Lang, Z. physiol. Ch. **173**, 32 (1928).

<sup>2)</sup> H. Holter, K. Linderström-Lang & J. F. Brönnicke, Z. physiol. Ch. **206**, 85 (1932).

<sup>3)</sup> Die salzsäure Lösung wurde nach den Angaben von O. Mellander hergestellt. Siehe Upsala Läkareförenings förhandlingar **LII**, 3 – 4 (1947).

Substrat: Na-Caseinat, pH 6,80, 5-proz.; Nach 26 Stunden wurde die Konzentration durch Zugabe neuer Lablösung auf 2,5% gesenkt. Überschichtung mit Toluol.

Labkonzentration: Anfangs 1,04 mg Lab-Stickstoff bzw. 260 L. E. pro cm<sup>3</sup>. Nach 26 Stunden Zugabe neuer Lablösung, Totalkonzentration 1,20 mg Lab-N bzw. 300 L. E. pro cm<sup>3</sup>.

Tabelle 2.

t	a	a - a <sub>0</sub>	a <sub>∞</sub> - a	log(a <sub>∞</sub> - a) + 2
0	0,55	0	0,28	1,45
0,15	0,57	0,02	0,26	1,42
0,40	0,63	0,08	0,20	1,30
0,77	0,65	0,10	0,18	1,26
0,87	0,69	0,14	0,14	1,15
1,62	0,72	0,17	0,11	1,04
1,75	0,73	0,18	0,10	1,00
2,32	0,74	0,19	0,09	0,95
2,40	0,77	0,22	0,06	0,78
4,49	0,79	0,24	0,04	0,60
4,62	0,80	0,25	0,03	0,48
6,95	0,80	0,25	0,03	0,48
24,32	0,83	0,29		
26,00		Zusatz frischen Labes		
26,03	0,49	0		
26,13	0,48	- 0,01		
29,45	0,50	+ 0,01		
31,45	0,49	0		
47,61	0,52	+ 0,03		

Die Bedeutung von t, a, a - a<sub>0</sub> ist bei Tabelle 1 gegeben. a<sub>∞</sub> ist der Titrationswert nach 24 Stunden, wo die Reaktion völlig zum Stillstand gekommen ist. a<sub>∞</sub> - a ist dann ein Mass für die jeweils noch vorhandenen, durch Lab hydrolysierbaren Bindungen.

In Figur 1, Kurve II, ist der Anstieg der Titrationswerte während der ersten Stunden wiedergegeben. Der erneute Labzusatz bei gleichzeitiger Substratverdünnung nach 26 Stunden sollte zeigen, ob das Flachwerden der Kurve durch den völligen Verbrauch der angreifbaren Bindungen oder durch eine Inaktivierung des Fermentes bedingt ist. Der Versuch hat eindeutig gezeigt, dass ersteres der Fall ist. In andern Versuchen wurden sogar noch grössere Labmengen nachgegeben, ohne dass der Abbau weitergetrieben werden konnte. Der Endwert der Titration ist demnach ein Mass für die maximale Zahl der durch das Lab spaltbaren Bindungen.

Falls der Abbau — wie die meisten Hydrolysen — eine Reaktion erster Ordnung ist, dann sollte log (a<sub>∞</sub> - a) aufgetragen gegen die Zeit eine Gerade ergeben. Figur 2 zeigt, dass die gefundenen Werte von der Geraden systematisch abweichen. Die Steigung der Kurve, die ein Mass für die Reaktionsgeschwindigkeit ist, nimmt mit der Zeit ab. Das kann verschiedene Gründe haben, denen aber nicht weiter nachgegangen wurde. Wir haben bei jeder Messreihe versucht, an den Ausgangspunkt der Kurve (t → 0) die Tangente zu legen.

Ihre Steigung K ist ein Mass für die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit. Den K-Werten kommt keine grosse Genauigkeit zu, aber sie erweisen sich bei der Diskussion doch als nützlich.

Es wurden insgesamt in 7 Abbauversuchen an 5-proz. Na-Caseinatlösungen vom pH 6,8 mit wechselnden Labmengen (0,28 mg Lab-N = 70 L. E. pro cm<sup>3</sup> bis max. 1,20 mg

Lab-N = 300 L. E. pro cm<sup>3</sup>) die maximale Zunahme der sauren Gruppen bestimmt. Bei zwei Versuchen wurde auch die Zunahme der basischen Gruppen bestimmt.

Über den Abbau in den salzauren Caseinlösungen (1,7%, pH 2,3) liegen nur zwei Messreihen vor, bei denen der max. Zuwachs an sauren Gruppen bestimmt wurde (labfreier Kontrollversuch; 298 und 315 L. E./cm<sup>3</sup>).

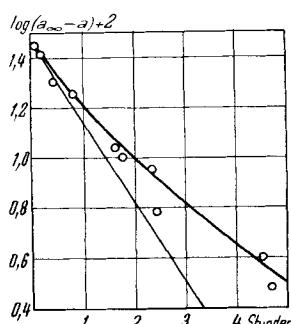


Fig. 2.

Inzwischen hatte sich der Vorrat an kristallisiertem Lab erschöpft, so dass vorerst keine weiteren Versuche gemacht werden konnten.

Bei allen Versuchen war der Kurvenverlauf ähnlich, weshalb wir nur eine Zusammenfassung der Ergebnisse mitteilen (Tab. 3).

Tabelle 3.

pH des Substrates	Max. Zunahme der titrierbaren Gruppen in Milläquiv./g Casein saure	Max. Zunahme der titrierbaren Gruppen in Milläquiv./g Casein basische	Aktivität des Labes – K/L <sup>1</sup> )
6,8	0,28 <sup>2)</sup>	0,22 <sup>3)</sup>	0,35 <sup>4)</sup>
2,3	1,07 <sup>5)</sup>	—	0,15 <sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> K = Steigung der Tangente, bzw. Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zu Beginn der Reaktion. L = Labkonz. in mg Lab-N pro cm<sup>3</sup>.

<sup>2)</sup> Mittelwert. Einzelwerte: 0,27; 0,30; 0,28; 0,25; 0,31; 0,29.

<sup>3)</sup> Einzelwerte: 0,25; 0,20.

<sup>4)</sup> Einzelwerte: 0,41; 0,39; 0,21; 0,37 0,38 0,35; 0,39; 0,22.

<sup>5)</sup> Einzelwerte: 1,06; 1,09. <sup>6)</sup> Einzelwerte: 0,12; 0,17.

## 2. Diskussion.

Die Versuche zeigen, dass auch reinstes kristallisiertes Lab am Casein einen Abbau bewirkt, dessen zeitlicher Verlauf titrimetrisch bis zu seinem Ende verfolgt werden kann. Es bedarf dazu allerdings relativ sehr grosser Labkonzentrationen.

Ein Bild über das Ausmass der maximalen Spaltung vermittelt folgende Betrachtung: Wenn bei pH 6,8 im Mittel 0,25 Milläquivalente titrierbarer Gruppen pro g Casein frei gemacht werden, so entspricht das der Spaltung einer Bindung pro 4000 Molgewichtseinheiten Casein oder pro 33 Aminosäureresten, wenn wir deren durchschnittliches Gewicht mit 120 annehmen. Bei pH 2,3 wird auf ca. 8 Aminosäuren 1 Bindung gespalten.

Es darf nicht ohne weiteres angenommen werden, dass es sich bei den gespaltenen Bindungen ausschliesslich um Peptidbindungen handelt. Folgende Bindungen oder Reste, bei deren Hydrolyse titrierbare Gruppen entstehen, müssen vor allem mit in Betracht gezogen werden: Säureamidbindungen, Esterbindungen, Phosphamidbindungen, Guanidinreste.

Wenn in grösserem Umfang Amidbindungen des Glutamins und Asparagins gespalten worden wären, hätten wir weniger saure als basische Gruppen gefunden, denn diese Spaltung wird durch die NaOH-Titration in 50-proz. Alkohol nur zum Teil erfasst<sup>1)</sup>. Es war nicht der Fall, also können Amidbindungen höchstens in geringem Masse beteiligt sein.

Esterbindungen geben nur saure Gruppen. Die Tatsache, dass etwas mehr saure als basische Gruppen gefunden wurden, spricht stark dafür, dass in gewissem Umfang Esterspaltung stattgefunden hat. Quantitative Aussagen können aber nicht gemacht werden. Die einzige Esterbindung, die im Casein nachgewiesen worden ist, ist übrigens die der Phosphorsäure an das Serin.

Die Phosphorsäureamidbindung ist zwar im Casein bisher noch nie nachgewiesen worden, aber dennoch muss ihr besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden, nachdem *Holter & Si-Oh Li*<sup>2)</sup> nachgewiesen haben, dass Lab, sowie Pepsin und Chymotrypsin Phosphamidase-Aktivität besitzen, und dass diese Aktivität sogar der Gerinnungsaktivität gegenüber Milch parallel geht.

Wir können nicht sagen, ob bei unseren Versuchen Phosphamidbindungen gespalten wurden oder nicht. Wir können nur feststellen, dass eine solche Spaltung auf keinen Fall etwa ausschliesslich für die Zunahme der sauren und basischen Gruppen verantwortlich gemacht werden kann. Wenn man nämlich den extremsten, ganz unmöglichen Fall annimmt, dass der gesamte Phosphor (0,86 %) des Caseins als  $H_3PO_4$  aus 3facher Amidbindung freigemacht würde, so gäbe das 0,83 Milliäquivalente pro g Casein. Das ist zwar mehr als beim neutralen Abbau gefunden wurde, aber weniger als beim sauren.

Man kann sich fragen, ob durch unsere Versuche die proteolytische Aktivität des Labes gegenüber Casein wirklich bewiesen ist. Wenn überhaupt keine Peptidbindungen, sondern nur die vorgenannten Bindungen gespalten würden, so könnten allerdings unter Umständen Titrationswerte herauskommen, wie wir sie als Maximalwerte bei pH 6,8 gefunden haben. Die Spaltung dieser Gruppen allein würde aber nicht zu einer merklichen Verkleinerung der Proteinmolekülen führen. Dass aber relativ niedermolekulare, die Ninhydrinreaktion

<sup>1)</sup> Die  $NH_4^+$ -Ionen sind beim Umschlagspunkt des Indikators noch nicht alle entladen.

<sup>2)</sup> *H. Holter & Si-Oh Li*, loc. cit.

gebende Spaltstücke entstanden sind, haben uns erste orientierende Versuche mit der Papierchromatographie gezeigt.

Wir glauben deshalb, dass an der proteolytischen Aktivität des Labes gegenüber Casein nach unseren Versuchen nicht mehr zu zweifeln ist. Wie weit neben der Proteolyse auch noch andere Reaktionen mit im Spiele sind, bleibt abzuklären; wir hoffen, durch eine genauere analytische Untersuchung des weitgehend oder erschöpfend abgebauten Substrates in dieser Frage weiterzukommen.

Wir müssen uns nun noch fragen, ob die Aktivität unseres Labes nicht auf Spuren von Pepsin zurückzuführen ist. Das scheint zunächst nicht ganz ausgeschlossen, weil wir sehr grosse Mengen des Enzyms zusetzen und der von *Berridge* zur Reinheitsprüfung ausgeführte Löslichkeitstest einen sehr kleinen Gehalt an Pepsin nicht erfasst hätte. Dazu kommt noch, dass der Abbau bei pH 2,3 weiter geführt hat als bei pH 6,8. Dies ist aber nicht entscheidend, sondern wir müssen, um die Frage zu beantworten, die Reaktionsgeschwindigkeiten betrachten.

Dividiert man die dem Reaktionsbeginn zukommenden Geschwindigkeitskonstanten K durch die Labkonzentration, so erhält man für unter gleichen Bedingungen durchgeführte Versuche annähernd konstante Werte (vgl. Kolonne 4 in Tab. 3). Das bedeutet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymkonzentration proportional ist. Das Mittel dieser Werte ist bei pH 2,3 kleiner als bei pH 6,8. Bei pH 2,3 war nun allerdings die Ausgangskonzentration des Substrates auch kleiner (1,7% gegenüber 5% bei pH 6,8), was nicht unberücksichtigt bleiben darf, da ja unsere  $\log(a_{\infty} - a)$ -Kurve keine Gerade ist (Fig. 2). Wir haben deshalb für die Versuche bei pH 6,8 noch die Steigung der Tangente an diejenigen Punkte der Kurve ermittelt, wo der bereits erfolgte Umsatz  $(5 - 1,7)/5$  von  $a_{\infty}$  beträgt, wo m. a. W. dem Enzym noch gleich viel spaltbare Bindungen zur Verfügung standen, wie zu Beginn der Versuche bei pH 2,3. Das Mittel dieser Werte gibt 0,21. Diesen Werten kommt wegen der Unsicherheit beim Ziehen der Tangenten keine grosse Genauigkeit zu, aber sie zeigen mindestens, dass die hydrolytische Aktivität des Labes gegen Casein bei pH 2,3 von der gleichen Größenordnung ist, wie bei pH 6,8.

Damit ist bewiesen, dass die Aktivität unseres Präparates wirklich dem Lab selber und nicht etwa Spuren von Pepsin zukommt, denn es ist bekannt, dass die Aktivität des letzteren beim Übergang vom sauren zum neutralen pH um Größenordnungen abfällt.

Es sei daran erinnert, dass *Berridge*<sup>1)</sup> mit einer ganz anderen analytischen Methode gegenüber Hämoglobin ein pH-Optimum bei ca. 3,7 gefunden hat. Beim Casein dürfte die Bestimmung des Optimums daran scheitern, dass das Casein bei pH 3—5 schwer löslich ist und Aktivitätsmessungen an Niederschlägen und an Lösungen natürlich nicht vergleichbar sind.

Was lässt sich nun schliesslich auf Grund unserer Versuche zur Frage nach der Primärreaktion bei der Labgerinnung der Milch sagen?

<sup>1)</sup> *N. J. Berridge*, Biochem. J. **39**, 179 (1945).

Die von uns gemessenen Effekte wurden mit Labzusätzen erreicht, die, verglichen mit denen, die normalerweise zur Milchgerinnung angewendet werden, ungeheuer überdosiert sind. Aus unsern Versuchen lässt sich nun annähernd berechnen, welches Ausmass der hydrolytische Abbau in einem normalen Labungsversuch haben kann, wenn das Substrat Milch gerade koaguliert ist.

Dazu nehmen wir an, dass die Aktivität des Labes gegenüber Milch ungefähr gleich wie gegen unsere Caseinlösung vom pH 6,8 ist. Unter Verwendung des *Storch-Segelcke*' schen Gesetzes kommen wir dann für eine Labkonzentration von 250 L. E. pro cm<sup>3</sup> Milch, was ungefähr unserm Versuch 7 entspricht, bei 35° auf eine theoretische Gerinnungszeit von  $6 \cdot 10^{-4}$  Minuten. Einen Temperaturkoeffizienten von 2 pro 10° angenommen, entspricht das bei 25° einer Einwirkungszeit von ca.  $12 \cdot 10^{-4}$  Minuten oder  $2 \cdot 10^{-5}$  Stunden. Mit Hilfe des K-Wertes lässt sich dann für diese Zeit der Umsatz ( $a - a_0$ ) berechnen.

Man erhält  $8 \cdot 10^{-4}$  Milliäquivalente pro g Casein. Das entspricht rund  $\frac{1}{300}$  des maximal möglichen Umsatzes, wenn derselbe zu 0,25 Milliäquivalenten angenommen wird. D.h., dass im Moment der Milchgerinnung erst auf etwa 1,2 Millionen Molgewichtseinheiten Casein (entsprechend ca. 10000 Aminosäureresten) eine Bindung hydrolytisch gespalten worden ist. Wahrscheinlich ist der Umsatz noch geringer, da das Casein in der Milch in viel gröberer Dispersion vorliegt als in einer Natriumcaseinat-Lösung.

Bei dieser Rechnung darf nur der Grössenordnung des Resultats Beachtung geschenkt werden; sie zeigt aber doch folgendes: Der hydrolytische Abbau des Caseins ist im Zeitpunkt, wo Milch unter der Wirkung von Lab gerinnt, so ausserordentlich gering, dass es aussichtslos erscheint, ihn durch die üblichen analytischen Methoden erfassen zu wollen. Wir verstehen jetzt auch, warum alle diesbezüglichen Versuche bisher gescheitert sind. Unsere Messungen beweisen nur, dass das Lab gegenüber Casein als Proteinase, vielleicht auch noch sonst als Hydrolase wirkt, aber ob und wie weit diese Reaktionen für die Milchgerinnung verantwortlich sind, vermögen sie nicht zu beantworten.

Es sieht so aus, als ob man der Primärreaktion nur auf indirektem Wege wird beikommen können. Einen ersten bemerkenswerten Schritt auf diesem Wege haben *Holter & Si-Oh Li* mit ihrer schon zitierten Arbeit getan.

Die Tatsache, dass ein so geringfügiger, analytisch direkt nicht erfassbarer Eingriff zur Fällung des Calciumcaseinates der Milch führen kann, ist erstaunlich. Man muss allerdings bedenken, dass das Protein ja nicht molekular gelöst, sondern in einer ziemlich groben Dispersion<sup>1)</sup> vorliegt. Der Angriff des Fermentes wird sich wohl zunächst auf die Oberfläche der kugeligen Teilchen konzentrieren.

<sup>1)</sup> Vgl. *Hs. Nitschmann*, Elektronenmikroskopische Grössenbestimmung der Ca-Caseinatteilchen in Kuhmilch, *Helv.* **32**, 1258 (1949).

Dort ist er aber besonders wirksam, weil ja die Koagulation auch eine Oberflächenreaktion ist. Dazu kommt noch, dass es genügt, wenn das Calcium- $\alpha$ -Caseinat durch das Labenzym verändert wird, denn es hält die schon im nichtfermentierten Zustande unlöslichen Calciumsalze des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Caseins in Lösung<sup>1)</sup>, indem es mit diesen zusammen die kolloiden Teilchen aufbaut und so als Schutzkolloid wirkt.

Die Hypothese von *Berridge*<sup>2)</sup>, nach welcher die enzymatische Primärreaktion eine Denaturierung zur Folge hat, die dann erst zur Koagulation des Calciumcaseinates führt, scheint immer noch besonders geeignet, die Schwierigkeiten, die bei der Erklärung der Folgen der Primärreaktion bestehen, zu überbrücken. Wir werden später über Versuche über die Hemmung der Labgerinnung der Milch durch Formaldehyd berichten, die diese Theorie zu stützen scheinen.

### Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, dass gelöstes Casein unter der Wirkung von kristallisiertem Lab einen hydrolytischen Abbau erleidet, der sich durch titrimetrische Bestimmung der Zunahme der sauren und der basischen Gruppen zeitlich verfolgen lässt. Durch Anwendung sehr grosser Labkonzentrationen lässt sich der Abbau innerhalb von Stunden bis zu seinem Ende treiben. Es wurde der Gruppenzuwachs bei erschöpfender Labung für Caseinlösungen vom pH 6,8 und 2,3 bestimmt. Die Hydrolyse muss mindestens zum Teil Peptidbindungen betreffen, doch können andere Bindungen mitbeteiligt sein. Es wird gezeigt, dass im Momente der Milchgerinnung erst ein winziger Bruchteil der maximalen Spaltung vollzogen sein kann. Die Frage nach der Primärreaktion der Labung bleibt offen.

Wir sind Herrn Dr. *N. J. Berridge*, University of Reading, England, für die Überlassung einer beträchtlichen Menge von kristallisiertem Lab zu grossem Dank verpflichtet.

Institut für organische Chemie der Universität Bern.

---

<sup>1)</sup> *E. Cherbuliez & P. Baudet*, Helv. **33**, 1673 (1950). Durch eigene unveröffentlichte Versuche bestätigt.

<sup>2)</sup> *N. J. Berridge*, Nature **149**, 194 (1942).