

II. Die Theorie von *Koutecky & Brdicka* für Reaktionsstufen in gepufferter Lösung wird auf Azobenzolmonocarbonsäure-(p) angewendet und die Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion zwischen H-Ion und Anion bestimmt. Die polarographisch ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten werden mit kinetisch berechneten verglichen.

III. Die Pufferverarmungs- und die Dissoziationszweistufigkeit werden verglichen und ihre charakteristischen Eigenschaften diskutiert.

Physikal.- und Elektrochem. Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

248. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. VI¹⁾. Über die Phosphatasewirkung des Labes.

von H. Mattenheimer²⁾, Hs. Nitschmann und P. Zahler

(25. VIII. 52.)

Einleitung.

In einer vorangegangenen Arbeit dieser Serie hatten *Nitschmann & Varin*³⁾ nachgewiesen, dass bei der Einwirkung von kristallisiertem Lab auf gelöstes Casein ein hydrolytischer Abbau stattfindet, der bei genügend hoher Dosierung des Enzyms zu einer titrimetrisch gut feststellbaren Zunahme der sauren und basischen Gruppen führt. Wenn jene Messungen den proteolytischen Abbau auch unzweifelhaft nachgewiesen hatten, so blieb doch die Frage offen, ob das Lab neben Peptidbindungen nicht auch noch andere Bindungen gespalten hatte. Neben der Säureamidbindung, die im Casein sehr reichlich vorkommt, ist vor allem die Phosphorsäureesterbindung in Betracht zu ziehen, denn verschiedene Beobachtungen lassen vermuten, dass die Phosphorsäure im Casein bei der Labgerinnung der Milch irgendeine bedeutsame Rolle spielt.

*Rimington & Kay*⁴⁾ haben z. B. festgestellt, dass dephosphoryliertes Casein mit Lab und Ca-Ionen nicht mehr zur Gerinnung gebracht werden kann, dass die Gerinnbarkeit aber nach Rephosphylierung des Caseins zurückkehrt. *Neuberg & Oertel*⁵⁾ wollen sogar

¹⁾ Nr. V dieser Reihe: *Helv.* **35**, 553 (1952).

²⁾ Derzeitige Adresse: Physiologisch-chemische Anstalt der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem.

³⁾ IV: *Hs. Nitschmann & R. Varin*, *Helv.* **34**, 1421 (1951).

⁴⁾ *C. Rimington & H. D. Kay*, *Biochem. J.* **20**, 777 (1926).

⁵⁾ *C. Neuberg & W. Oertel*, *Bioch. Z.* **60**, 491 (1914).

beobachtet haben, dass Ca-haltige Lösungen von phosphoryliertem Serumglobulin mit Lab gerinnen, ein Befund, der jedoch von *Rimington & Kay*¹⁾ nicht reproduziert werden konnte, weil ihre Präparate schon mit Calcium allein flockten. Im Hinblick darauf, dass alle bisher untersuchten proteolytischen Fermente mehr oder weniger gut Milch zur Gerinnung bringen, muss die Tatsache beachtet werden, dass bei einigen derselben auch eine Phosphatasewirkung nachgewiesen wurde. Nach *Rimington & Kay* spaltet z. B. Trypsin sowohl aus Casein als auch aus Phosphorpepton 100% der Phosphorsäure ab, während Pepsin unwirksam ist. Andererseits sind Phosphatasen bekannt, die aus dem unabgebaute Casein Phosphorsäure abzuspalten vermögen, allerdings ohne dass bei ihnen eine milchgerinnende Wirkung nachgewiesen wäre²⁾. Schliesslich muss an die wichtige Arbeit von *Holter & Li*³⁾ erinnert werden, in welcher sie zeigten, dass kristallisiertes Lab Phosphamidasewirkung besitzt, indem es aus niedermolekularen Phosphamiden Phosphorsäure abzuspalten vermag. Dasselbe tun auch kristallisierte Präparate von Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin.

Untersuchungen über eine eventuelle Phosphataseaktivität des Labes sind bisher nicht bekannt geworden. Wir haben deshalb solche in Ergänzung zur Arbeit von *Nitschmann & Varin* vorgenommen. Jener wie dieser Arbeit liegt der Gedanke zugrunde, unter Verwendung genügend grosser Dosen von Lab zunächst einmal festzustellen, zu was für enzymatischen Leistungen dieses Ferment überhaupt befähigt ist. Die Kenntnis aller Möglichkeiten sollte dann die Aufklärung der immer noch unbekannten Primärreaktion bei der Labgerinnung der Milch erleichtern.

Wir haben die Wirkung von kristallisiertem sowie technischem Lab auf Phosphopepton aus Casein, auf Glycerophosphat und schliesslich auch gegenüber Casein selbst geprüft.

Die verwendeten Labpräparate waren:

1. „*Hansen-Lab*“: Trockenlab der Firma *Hansen*, Kopenhagen, Spezialpräparation, ca. 8mal stärker als handelsüblich⁴⁾.
2. „*Marshall-Lab*“. Handelstrockenpräparat der Firma *Marshall*, Madison, Wisconsin, USA.
3. Kristallisiertes Lab von *N. J. Berridge*⁵⁾. Es handelt sich um dasselbe Präparat, das in Nr. V dieser Publikationsreihe beschrieben worden ist⁶⁾.

¹⁾ *C. Rimington & H. D. Kay*, Biochem. J. **20**, 777 (1926).

²⁾ *C. Rimington*, Biochem. J. **21**, 272 (1927); *D. L. Harris*, J. Biol. Chem. **165**, 541 (1946); *R. N. Feinstein & Volk*, J. Biol. Chem. **177**, 339 (1949); *B. Norberg*, Acta chem. scand. **4**, 1206 (1950).

³⁾ *H. Holter & Si-Oh Li*, Acta chem. scand. **4**, 1321 (1951).

⁴⁾ Wir sind der Firma *Hansen* für die freundliche Überlassung dieses Präparates zu Dank verpflichtet.

⁵⁾ *N. J. Berridge*, Biochem. J. **39**, 179 (1945). Wir möchten Herrn Dr. *Berridge* auch an dieser Stelle für die Überlassung dieses wertvollen Präparates danken.

⁶⁾ *H. Schwander, P. Zahler & Hs. Nitschmann*, loc. cit.

I. Versuche mit Phosphopepton und Glycerophosphat als Substrat (bearbeitet von H. Mattenheimer).

Das Phosphopepton wurde in Anlehnung an die Verfahren von *Rimington & Kay*¹⁾ und *Levene & Hill*²⁾ durch tryptischen Abbau von Casein hergestellt:

5 Liter einer 10-proz. Lösung von technischem Säurecasein wurden bei pH 8—8,5 und Toluolzusatz 44 Std. mit 15 g handelsüblichem Trypsin bei 37° inkubiert. Fällung des anorganischen Phosphats durch Ba(OH)₂ bei pH 7,5. Fällung des Phosphopeptons als Bleisalz mit Bleiacetat bei pH 5,6. Niederschlag in 10-proz. Soda gelöst (pH 9) und vom ungelösten BaCO₃ abgetrennt. Lösung mit H₂S entbleien. Kolloidal gelöstes PbS durch Ausschütteln mit Toluol weitgehend entfernen. Fällung des Na-Phosphopeptons bei pH 8 mit 3 Vol. Alkohol in der Kälte. Sirupösen wasserlöslichen Niederschlag mit Alkohol nochmals umfällen und mit Aceton trocknen. Analyse:

Anorganischer Phosphat —P	= 0,11%
Organisch gebundener Phosphat —P	= 3,61%
N	= 8,39%
Atom-Quotient N:P (org.)	= 5,15

Herstellung der Lablösungen. *Hansen-Lab* wurde zur Entfernung der Hauptmenge NaCl 1mal rasch mit dest. Wasser gewaschen, dann in Acetat-Puffer pH 5—6 suspendiert und intensiv homogenisiert. Die zentrifugierte, leicht opalescente, gelbliche Lösung wurde mit Essigsäure oder NaOH auf das gewünschte pH eingestellt.

Gleiches Vorgehen bei *Marshall-Lab*.

Beim kristallisierten Lab wurde 1 cm³ der Suspension von der Mutterlauge abzentrifugiert, die Kristalle einmal mit Wasser und einmal mit Acetat-Puffer pH 5 gewaschen und dann in Veronalpuffer pH 6,7 gelöst. Der Puffer soll kein NaCl enthalten, da dieses schon in geringen Konzentrationen die Löslichkeit stark vermindert. Das Versuchs-pH wurde mit Essigsäure eingestellt; unter pH 5,3 fiel das Ferment wieder aus.

Phosphatbestimmung. Die kolorimetrische Bestimmung der aus organischer Bindung freigesetzten Phosphorsäure erfolgte nach der Methode von *Lowry & Lopez*³⁾, die jedoch etwas modifiziert werden mussste, da die *Hansen-Lab*-Lösung Substanzen enthält, die nicht mit Trichloressigsäure, wohl aber mit Ammoniummolybdat fällbar sind.

Sulfuriertes Polystyrol⁴⁾ erwies sich als geeignetes zusätzliches Fällmittel, wenn ausserdem noch NaCl zugesetzt wurde.

Enteiweißung: 1,0 cm³ Ansatzgemisch,
0,3 cm³ 50-proz. Trichloressigsäure,
0,8 cm³ 1-proz. Lösung von sulfuriertem Polystyrol,
0,9 cm³ gesättigte NaCl-Lösung.

Für die Phosphatbestimmung wurde ein aliquoter Teil des Zentrifugates genommen. Wegen des NaCl-Zusatzes war die Farbintensität des reduzierten Phosphoammonium-molybdate nicht konstant, sondern nahm langsam weiter zu, ohne dass im Laufe mehrerer Stunden ein konstanter Endwert erreicht wurde. Es war deshalb notwendig, die Ablesungen innerhalb einer ganz bestimmten Zeit nach Hinzufügen des Reduktionsmittels (Ascorbinsäure) vorzunehmen. Es wurde folgendermassen verfahren:

Proben nach Zusatz der Reagenzien 3 Min. auf 40° erwärmen, 3 Min. in Leitungswasser kühlen und nach weiteren 18—25 Min. Stehen bei Zimmertemperatur im *Beckman*-Spektrophotometer bei 870 m μ kolorimetrieren. Innerhalb dieser Zeit nimmt die Farbintensität nur ganz minimal zu. Es wurde eine Eichkurve mit bekannter Phosphatmenge mit genau gleichen Zusätzen und Bedingungen aufgenommen.

¹⁾ C. Rimington & H. D. Kay, Biochem. J. **20**, 777 (1926).

²⁾ P. A. Levene & D. W. Hill, J. Biol. Chem. **101**, 711 (1933).

³⁾ O. H. Lowry & J. A. Lopez, J. Biol. Chem. **162**, 421 (1945).

⁴⁾ 0,53 Mole —SO₃H pro Styrolrest. Herstellung siehe: R. Signer & A. Demagistri, J. Chim. Phys. **47**, 704 (1950).

Alle Versuchsreihen, die für das Schlussergebnis von entscheidender Bedeutung waren, wurden mehrfach, mindestens aber einmal wiederholt. Aus der grossen Zahl der Versuche geben wir hier die wichtigsten wieder.

Tab. 1 und Fig. 1: Wirkung von Hansen-Lab in verschiedenen Konzentrationen auf Phosphopepton. Ansätze:

4 cm³ Hansen-Lablösung (Konz. siehe Tab. 1),

4 cm³ Phosphopeptonlösung (10 mg pro cm³),

pH 5,2; 25°¹⁾.

Tabelle 1.

L.E. ²⁾ pro cm ³ der zugesetzten Lablösung	a = P ₂ O ₅ abgespalten in % des gesamten org. gebundenen P ₂ O ₅ ; nach Std.					Aktivität ³⁾ (willkürliche Einheit)
	24	48	72	96	120	
190	12,8	21,8	26,2	29,3	31,5	3,3
38	8,2	13,5	17,3	18,0	18,3	11,0
8	3,0	3,8	5,2	6,0	6,3	12,5

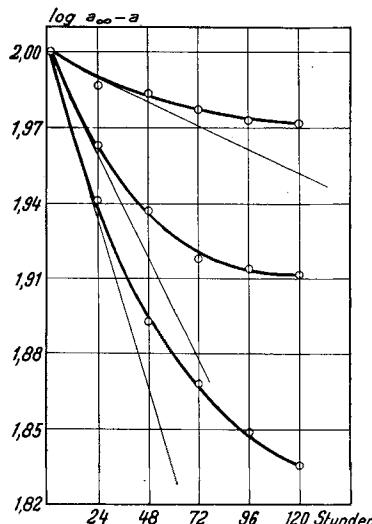


Fig. 1.

In Fig. 1 bedeutet $a_{\infty} - a$ die zur betr. Zeit noch nicht abgespaltene Menge P₂O₅ in %. Kontrollversuche mit Pepton allein und Lab allein haben keine P₂O₅-Abspaltung ergeben.

Tab. 2: Langdauernder Abbau von Phosphopepton durch Hansen-Lab.

Ansätze: 5 cm³ Hansen-Lablösung (200 L.E. pro cm³),

5 cm³ Phosphopepton (2,5 mg pro cm³),

pH 5,2; 30°.

1) Alle Ansätze wurden durch Zusatz von etwas Thymol oder Toluol vor Bakterienwachstum geschützt.

2) L.E. = Lab-Einheiten. 1 L.E. entspricht in dieser Arbeit derjenigen Labmenge, die -- gelöst in 1 cm³ – 10 cm³ frische Magermischmilch bei 35° in 100 Sek. zur Gerinnung bringt.

3) Steigung (K) der Tangente (Fig. 1) durch Labmenge (L.E.).

Tabelle 2.

	Inkubationsdauer in Std.					
	24	72	120	168	312	578
% P ₂ O ₅ abgespalten . .	20,2	34,6	43,4	48,1	66,3	78,0

Tab. 3: pH-Abhängigkeit der Wirkung von *Hansen-Lab* auf Phosphopepton.

Ansätze: 3 cm³ *Hansen-Lab*-Lösung (200 L.E. pro cm³),
3 cm³ Phosphopeptollösung (5 mg pro cm³),
Verschiedene pH; 25°.

Tabelle 3.

pH	% P ₂ O ₅ abgespalten, nach Stunden			
	12	36	60	84
3,9	5,8	8,2	11,6	13,0
4,9	11,6	16,0	21,7	23,2
5,9	5,8	8,0	11,3	13,1
7,1	1,4	0	0	1,4

Tab. 4: Wirkung von kristallisiertem Lab auf Phosphopepton mit und ohne Aktivatorzusatz.

Ansätze: 2 cm³ Lösung von kristallisiertem Lab (90 L.E. pro cm³),
1,5 cm³ Peptonlösung (20 mg pro cm³),
1,5 cm³ Aktivator,
pH 5,4; 25°.

Zur Aktivierung wurden verwendet:

A = aufgekochte *Hansen-Lab*-Lösung (ursprünglich 200 L.E. pro cm³),
B = Ultrafiltrat von A,
C = Milchultrafiltrat.

Tabelle 4.

Aktivator	Spezielle Bedingungen	% P ₂ O ₅ abgespalten nach Stunden			
		24	60	96	120
ohne	—	0	—	—	0
A	—	1,2	1,8	3,6	4,8
B	—	1,2	2,4	3,0	4,7
A	ohne Lab	0	—	—	0
C	—	1,2	3,0	4,2	4,6
C	ohne Lab	0	—	—	0
C	ohne Pepton	0	—	—	0

Tab. 5: pH-Abhängigkeit der Wirkung von aktiviertem kristallisiertem Lab auf Phosphopepton.

Ansätze: 2 cm³ Lösung von krist. Lab (90 L.E. pro cm³),
2 cm³ Phosphopepton (10 mg pro cm³) gelöst in aufgekochter *Hansen-Lab*-Lösung (200 L.E. pro cm³),
Verschiedene pH; 25°.

Tabelle 5.

pH	% P ₂ O ₅ abgespalten nach Stunden	
	24	48
5,2	2,9	5,8
5,6	2,9	7,2
6,1	2,9	5,6

Tab. 6: Wirkung von *Hansen*-Lab auf Phosphopepton und auf Glycerophosphat mit und ohne Fluoridzusatz.

Ansätze: 2 cm³ *Hansen*-Lablösung (200 L.E. pro cm³),

1 cm³ Phosphopeptonlösung (12,5 mg pro cm³) bzw. Glycerophosphatlösung (0,6 mg pro cm³),

1 cm³ NaF-Lösung bzw. Puffer,
pH 5,4; 25°.

Tabelle 6.

Substrat	NaF-Konz. in der Mischung	% P ₂ O ₅ abgespalten nach Stunden			
		24	36	84	96
Phosphopepton .	0	—	9,3	15,0	—
Phosphopepton .	m/100	—	5,2	6,9	—
Phosphopepton .	m/1000	—	5,8	11,8	—
Glycerophosphat .	0	8,1	—	—	12,1
Glycerophosphat .	m/100	1,0	—	—	2,0
Glycerophosphat .	m/1000	1,0	—	—	4,0

Tab. 7: Wirkung von aktiviertem kristallisiertem Lab auf Phosphopepton und auf Glycerophosphat mit und ohne Fluoridzusatz.

Ansätze: 1,5 cm³ krist. Lab (90 L.E. pro cm³),

1,5 cm³ aufgekochte *Hansen*-Lablösung (200 L.E. pro cm³),

0,75 cm³ Substrat (wie bei Tab. 6),

0,25 cm³ NaF-Lösung bzw. Puffer,

pH 5,4; 25°.

Tabelle 7.

Substrat	NaF in der Mischung	% P ₂ O ₅ abgespalten nach Stunden	
		96	
Phosphopepton .	0	10,9	
Phosphopepton .	m/100	10,9	
Glycerophosphat .	0	0	

Tab. 8: Wirkung von *Marshall*-Lab (aktiviert und nicht aktiviert) auf Phosphopepton und auf Glycerophosphat.

Ansätze: 2 cm³ *Marshall*-Lab (72 L.E. pro cm³),

2 cm³ Phosphopepton oder Glycerophosphat (wie bei Tab. 6),

1 cm³ Milchultrafiltrat oder Puffer,

pH 5,2; 25°.

Tabelle 8.

Substrat	Zusatz	% P ₂ O ₅ abgespalten nach Stunden		
		12	24	48
Phosphopepton .	Puffer	—	0	0
Phosphopepton .	Milch-U.F.	2,3	—	3,5
Glycerophosphat .	Puffer	—	5,1	9,1

II. Versuche mit Casein als Substrat (bearbeitet von P. Zahler).

Beim Abbau des Caseins mit Lab entstehen in vorgerückteren Stadien Produkte, die auch durch die beim Phosphopepton verwendete Kombination von Trichloressigsäure, Polystyrolsulfonsäure und NaCl nicht gefällt werden, dafür dann aber beim Zusatz des Molybdates Trübungen ergeben, die eine kolorimetrische Bestimmung verunmöglichen. Wir fanden, dass die Phosphatbestimmungsmethode von *Berenblum & Chain*¹⁾ in der Modifikation von *Martin & Doty*²⁾ hier sehr geeignet ist. Bei dieser Methode wird der Phosphor-Molybdänsäure-Komplex mit Isobutylalkohol/Benzol (1:1) ausgezogen und dann in dieser Lösung durch alkoholische SnCl₂-Lösung in Molybdänblau übergeführt. Proteine und störende Abbauprodukte werden vor dem Ausschütteln mit Silicowolframat niedergeschlagen. *Martin & Doty* haben nach der Zugabe des letzteren eventuell entstehende Niederschläge nicht entfernt. Bei unsrern Ansätzen, die sehr viel Protein enthielten, erwies sich aber eine Vorenteiweisung als unbedingt erforderlich. Wir arbeiteten deshalb unter leichter Abänderung, aber bei Verwendung der gleichen Reagenzien wie in der Originalvorschrift, folgendermassen:

1 cm³ Substrat (enthaltend 6% Casein, z.T. abgebaut) mit 1 cm³ H₂O, 0,5 cm³ 50-proz. Trichloressigsäure und 2 cm³ Silicowolframat-Reagens versetzen. Niederschlag abzentrifugieren, 3 cm³ der klaren Lösung mit 1 cm³ H₂O, 5 cm³ Isobutylalkohol/Benzol und 1 cm³ Molybdatreagens versetzen und mit Gummistopfen verschlossen sofort 15 Sek. schütteln. Phasen trennen lassen. 2 cm³ der organischen Phase in 10 cm³ Messkolben abpipettieren. Unter Ausspülen der Pipette mit alkoholischer Schwefelsäure auf ca. 9 cm³ auffüllen, 0,2 cm³ SnCl₂-Reagens zugeben. Mit alkoholischer Schwefelsäure zur Marke auffüllen und mischen. Kolorimetrieren bei 625—725 m μ . Wir benützten hier ein *Zeiss-Pulfrich*-Kolorimeter mit 1 cm Küvetten und Filter Nr. 9.

Die Farbintensität ist bei dieser Methode zwischen 10 Min. und 24 Std. konstant. Testversuche, bei denen Na-Caseinatlösungen (frisch und fermentativ abgebaut) bekannte Mengen von anorganischem Phosphat zugesetzt worden waren, ergaben sehr gute Resultate. Die Fehlerbreite der Methode beträgt etwa $\pm 0,2 \gamma$ P bei einer total bestimmbaren Menge von ca. 10 γ . Da wir bei den Abbauversuchen jeweils 1 cm³ 6-proz. Caseinatlösung analysierten, machen diese erfassbaren 0,4 γ , 0,083% des gesamten P-Gehaltes der Probe aus.

Als Substrat für die nachfolgenden Versuche verwenden wir frisch hergestelltes, unter Vermeidung extremer pH dreimal umgefälltes und mit Alkohol und Äther extrahiertes Säurecasein aus Mischnmilch. Es hatte im Calciumtitrationstest nach *Nitschmann & Lehmann*³⁾ die für ein frisches Säurecasein typische Unempfindlichkeit gegen die fallende Wirkung von Ca-Ionen gezeigt. Seine analytischen Daten waren:

N-Gehalt, total	= 15,7 %
P-Gehalt, total	= 0,86%
P als freies PO ₄ ³⁻ in % des Total-P	= 0,18%
P org. gebunden, aber mit Trichloressigsäure nicht fällbar in % des Total-P	= 0,51%

¹⁾ I. Berenblum & E. Chain, Biochem. J. **32**, 295 (1938).

²⁾ J. B. Martin & D. M. Doty, Anal. Chem. **21**, 965 (1949).

³⁾ Hs. Nitschmann & W. Lehmann, Helv. **30**, 804 (1947).

Für die Abbauversuche wurde eine 9-proz. Stammlösung von Na-Caseinat hergestellt. Beim Lösen wurde durch sehr langsames Zugeben der NaOH Sorge getragen, dass das pH auch vorübergehend nie über 8 stieg. Die fertige Lösung wurde mit Thymol versehen im Eisschrank aufbewahrt. Lösungen, die älter als 4 Tage waren, wurden nicht mehr verwendet.

Herstellung der Lablösungen siehe unter I.

Tabelle 9: Wirkung von *Hansen*-Lab und von kristallisiertem Lab auf Casein. Von den 2- bis 3fach durchgeführten Versuchsreihen ist je nur eine wiedergegeben.

Substrat I: Na-Caseinat, 9-proz., pH 6,92.

Substrat II: Na-Caseinat, 9-proz., pH 5,94.

Fermente: HL (118) = *Hansen*-Lablösung (118 L.E. pro cm³),
HL (0) = Gleiche Lösung, durch Kochen inaktiviert,

KL (84) = Lösung von kristallisiertem Lab (84 L.E. pro cm³),

KL (180) = Krist. Lab (180 L.E. pro cm³).

Alle mit pH 6,5–6,8.

- Ansätze:*
- a) 6 cm³ I + 1,5 cm³ HL (0) + 1,5 cm³ H₂O
 - b) 6 cm³ I + 1,5 cm³ HL (118) + 1,5 cm³ H₂O
 - c) 6 cm³ I + 1,5 cm³ KL (84) + 1,5 cm³ H₂O
 - d) 6 cm³ I + 1,5 cm³ KL (84) + 1,5 cm³ HL (0)
 - e) 6 cm³ I + 1,5 cm³ KL (180) + 1,5 cm³ HL (0)
 - f) 6 cm³ II + 1,5 cm³ HL (0) + 1,5 cm³ H₂O
 - g) 6 cm³ II + 1,5 cm³ HL (118) + 1,5 cm³ H₂O
 - h) 6 cm³ II + 1,5 cm³ KL (84) + 1,5 cm³ H₂O
 - i) 6 cm³ II + 1,5 cm³ KL (84) + 1,5 cm³ HL (0)

Temperatur stets 25°.

Tabelle 9.

Ansatz	Zeit in Std.	Kontrollen		% P ₂ O ₅ abgespalten
		pH	L.E. pro cm ³ Mischung	
b	0	6,92	19	0,53
	23	—	—	1,38
	54	—	—	2,30
	120	—	—	3,40
	192	7,2	5,3	3,70
g	0	6,20	19	0,59
	23	—	—	3,50
	54	—	—	6,90
	120	—	—	8,60
	192	6,37	8,2	10,35

Die Zahlenwerte werden nur für die Ansätze b und g mit aktivem *Hansen*-Lab gegeben. Die Werte für alle übrigen Ansätze liegen auf einer der Abscisse fast parallel laufenden Kurve (0 in Fig. 2). Nach 192 Std. beträgt hier die Phosphatabspaltung bei beiden pH ca. 0,2–0,25%, gleichgültig, ob kristallisiertes Lab und eventuell noch inaktiviertes *Hansen*-Lab zugegen ist oder nicht.

III. Diskussion.

Die Versuche in Abschnitt I (Tab. 1 bis 5) zeigen eindeutig, dass sowohl die untersuchten technischen Labpräparate, als auch das kristallisierte Lab dem Phosphopepton gegenüber Phosphatase-

aktivität besitzen, wobei das kristallisierte Lab wie auch das *Marshall*-Lab einen noch nicht näher untersuchten Aktivator benötigt, der in aufgekochter, d. h. inaktivierter *Hansen*-Lablösung und in Milchultrafiltrat vorkommt.

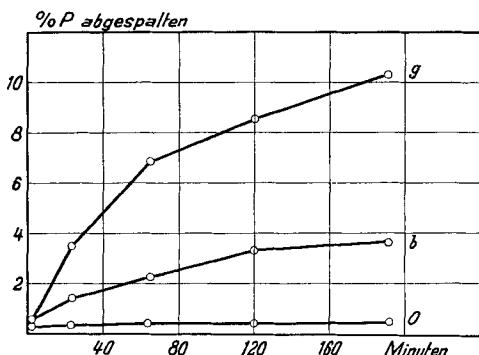


Fig. 2.

Vergleicht man entsprechende Konzentrationen von *Hansen*-Lab und kristallisiertem Lab (gemessen an den L. E. pro cm³), so fällt ohne weiteres die grössere Phosphataseaktivität des *Hansen*-Labes auf. Das könnte daran liegen, dass die Aktivierung des kristallisierten Labes keine vollständige war oder aber, dass im *Hansen*-Lab neben dem eigentlichen Lab noch eine weitere Phosphatase vorkommt. Betrachten wir zunächst die Möglichkeit einer unvollkommenen Aktivierung. In dem in Tab. 5 wiedergegebenen Versuch wurde zu 2 cm³ der Lablösung (krist.) mit zusammen 180 L.E. 2 cm³ aufgekochte *Hansen*-Lablösung zugesetzt, die ursprünglich 400 L.E. enthalten hatten und demnach auch Aktivator für 400 Einheiten enthalten sollten. Die erreichte Aktivität entsprach aber keineswegs dem Gehalt der Lösung des kristallisierten Labes an Labeinheiten, wie ein Vergleich mit dem Versuch der Tab. 1 zeigt. Dass zuviel Aktivator eventuell wieder hemmt, kann auch nicht zutreffen, da in hier nicht wiedergegebenen Versuchen mit geringeren Mengen aufgekochter *Hansen*-Lablösung annähernd die gleichen Effekte erzielt worden waren. Es sieht also so aus, als ob in unsren Versuchen mit kristallisiertem Lab genügend Aktivator für eine maximale Aktivierung zugesetzt worden wäre.

Was die stoffliche Natur des Aktivators anbetrifft, so wissen wir im übrigen vorerst nur, dass es eine hitzestabile und ultrafiltrierbare Substanz sein muss, die in unserem *Hansen*-Lab und in Milch vorkommt. Da nur geringe Mengen des kristallisierten Labes zur Verfügung standen, wurde vorerst nicht weiter nach dem Aktivator gesucht. Einzig Magnesiumion, an das man natürlich zuerst denkt,

wurde in den Konzentrationen Mg/org. gebundener P = 0,1, = 1,0, = 10 getestet, erwies sich aber als unwirksam.

Die zweite Frage, die nach dem Vorkommen einer weiteren Phosphatase im *Hansen*-Lab, kann wohl eindeutig positiv beantwortet werden. Dafür ergeben sich aus unsrern Messungen eine ganze Reihe von Gründen:

1. *Hansen*-Lab spaltet Phosphat aus allen drei Substraten, nämlich Casein, Phosphopepton und Glycerophosphat ab (Tab. 1 und 6). Kristallisiertes Lab spaltet unaktiviert aus keinem Substrat, aktiviert aber ausschliesslich aus Phosphopepton Phosphat ab (Tab. 4, 7 und 9).

2. Die Phosphatasewirkung des aktivierten kristallisierten Labes ist durch Fluorid nicht hemmbar (Tab. 7). Die Phosphataseaktivität des *Hansen*-Labes dagegen ist durch Fluorid deutlich hemmbar, und zwar die auf Glycerophosphat wesentlich stärker als die auf Phosphopepton (Tab. 6). m/100 Fluorid ist dabei wirksamer als m/1000.

3. Das *Marshall*-Lab ist phosphatatisch aktiv gegen Glycerophosphat. Gegen Phosphopepton wird es erst aktiv, wenn Milchultrafiltrat zugesetzt wird. Es enthält also im Gegensatz zum *Hansen*-Lab keinen Aktivator für das Lab.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Das eigentliche Labferment für sich allein besitzt gegen keines der drei Substrate Phosphataseaktivität. Es lässt sich aber mit Hilfe eines noch unbekannten Stoffes aktivieren, jedoch nur gegenüber Phosphopepton. Seine Aktivität ist dann durch Fluorid nicht hemmbar.

Das *Hansen*-Lab enthält bei dem von uns verwendeten Präparat den Aktivator, ist deshalb ohne weiteres gegen Phosphopepton aktiv. Ausserdem enthält es eine Phosphatase, die gegen Glycerophosphat ohne weiteres aktiv ist und vielleicht auch noch aus Phosphopepton oder gewissen Abbauprodukten, die aus Phosphopepton durch aktiviertes Lab entstehen, Phosphat frei machen kann. Diese Phosphatase ist durch Fluorid hemmbar. Dieselbe Phosphatase scheint auch im *Marshall*-Lab vorhanden zu sein, doch genügen unsere Versuche nicht, um die Identität sicherzustellen. Es sei ausdrücklich festgestellt, dass diese Phosphatasewirkung nicht etwa eine Nebenwirkung allfällig vorhandenen Pepsins sein kann. Schon *Rimington & Kay*¹⁾ haben festgestellt, dass Pepsin gegenüber Phosphopepton unwirksam ist. Wir konnten diesen Befund bestätigen (bei pH 5,2) und zudem selber noch auf Glycerophosphat ausdehnen.

Bei der im technischen Lab enthaltenen Phosphoesterase dürfte es sich wohl um die bekannte und weit verbreitete Phosphomonoesterase II, auch saure Phosphatase genannt, handeln.

¹⁾ Loc. cit.

Für die Deutung der Phosphatasewirkung des *Hansen*-Labes gegenüber Casein sind vor allem drei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen.

1. Es wirkt dieselbe Phosphatase, die Glycerophosphat spaltet. Sie spaltet Casein aber nicht direkt, sondern macht erst aus den Produkten des hydrolytischen Abbaues des Caseins durch das Lab Phosphat frei.

2. Die gegen Glycerophosphat wirksame Phosphatase wirkt auf Casein direkt phosphatatisch (nicht aber auf Phosphopepton).

3. Das *Hansen*-Lab enthält neben der Ester-Phosphatase noch eine besondere Phosphoprotein-Phosphatase.

Fall 1 ist wenig wahrscheinlich, wenn man den Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit betrachtet. Wenn man $\log a \infty - a$ gegen die Zeit aufträgt (nicht wiedergegeben!), so sieht man, dass die Reaktionsgeschwindigkeit sehr viel stärker abfällt, als bei einer monomolekularen Reaktion der Fall sein sollte. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante sinkt z. B. im Versuch g der Tab. 9 im Verlaufe der 192 Stunden auf $1/6$. Bei der unter 1. gemachten Annahme sollte die Konstante, wenn die Geschwindigkeitskonstanten der beiden Teilreaktionen ähnlich sind, aber eher ansteigen, da das Substrat ja erst im Laufe der Zeit gebildet wird. Da es aber immerhin möglich wäre, dass die Phosphatesterspaltung sehr viel rascher verläuft als die Proteolyse, so dass letztere allein geschwindigkeitsbestimmend ist, kann Fall 1 nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Fall 2 können wir auf Grund des eigenen Versuchsmaterials noch weniger ausschalten. Jedoch haben verschiedene Autoren, zuletzt *Anagnostopoulos, Pacht, Bourland & Grabar*¹⁾ gezeigt, dass Glycerophosphat spaltende Phosphomonoesterasen (unter ihnen die hier in Frage kommende saure Phosphatase II) aus Casein und künstlich phosphorylierten Proteinen kein Phosphat abspalten, es sei denn, die Substrate seien zuvor proteolytisch sehr stark abgebaut. In allerletzter Zeit hat allerdings *G. E. Perlmann*²⁾ mitgeteilt, dass saure Phosphatase aus Prostata und aus Darm aus α -Casein Phosphat abzuspalten vermag. β -Casein wird nicht angegriffen. *Perlmann* bestätigt aber, dass Gesamtcasein ($\alpha + \beta$) nicht oder nur sehr wenig gespalten wird, indem offenbar β als Inhibitor für die Dephosphorylierung von α wirkt.

Fall 3 ist der wahrscheinlichste, wenn man bedenkt, dass *Norberg*³⁾ reichlich Phosphoproteinphosphatase in der Magenschleimhaut — der Ratte allerdings — gefunden hat. Sie wirkt auf Casein und

¹⁾ C. Anagnostopoulos, M. Pacht, E. Bourland & P. Grabar, Bl. Soc. Chim. Biol. **33**, 699 (1952).

²⁾ IIe Congrès International de Biochimie, Paris 1952. Résumés des communications, p. 264; Am. Soc. **74**, 3191 (1952).

³⁾ B. Norberg, Acta chem. scand. **4**, 1206 (1950).

auf Phosphovitin und hat ein pH-Optimum bei 5,8. Wenn wir für das *Hansen*-Lab in seiner Wirkung gegen Casein auch kein genaues Optimum ermittelt haben (wegen der Unlöslichkeit des Caseins bei tieferen pH) so geht doch aus Tab. 9 hervor, dass die Aktivität von pH 7 gegen 6 ansteigt. Es könnte sich also hier sehr wohl um *Norberg's* Phosphoproteinphosphatase handeln, doch haben wir uns um die Identifizierung vorerst nicht weiter bemüht, da uns in erster Linie die Wirksamkeit des kristallisierten Labes interessierte¹⁾. *Norberg* hatte gefunden, dass die Phosphoproteinphosphatase auf Phosphopepton nicht einwirkt, ausgenommen in einem von acht Versuchen. Wir haben seine Experimente mit Rattenleber wiederholt und gefunden, dass Phosphopepton messbar gespalten wird, wenn man die Inkubationszeit auf Stunden ausdehnt. Es muss deshalb damit gerechnet werden, dass an der Spaltung des Phosphopeptons durch das *Hansen*-Lab auch Phosphoproteinphosphatase in geringem Umfang mitbeteiligt war.

Die Phosphatasewirkung des aktivierte kristallisierten Labes gegen Phosphopepton hat ihr pH-Optimum zwischen 5 und 6 (Tab. 5), diejenige des *Hansen*-Labes bei ca. 5 (Tab. 3).

Bei allen unsern Versuchen, wo eine Phosphatasewirkung vorhanden war, fiel die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit viel stärker ab, als es für eine monomolekulare Reaktion zu erwarten wäre. Dasselbe war schon für die proteolytische Wirkung des kristallisierten Labes gefunden worden²⁾. Für den Fall der Phosphatabspaltung aus Phosphopepton durch *Hansen*-Lab ist in Fig. 1 der Logarithmus der Menge der noch nicht gespaltenen Estergruppen gegen die Zeit aufgetragen. Die Steigung der Tangenten an den Ausgangspunkt dieser Kurven gibt ein Mass für die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit. Sie ist nicht proportional der Labmenge. Das Ferment ist in kleinen Konzentrationen relativ aktiver als in hohen (bei konstanter Substratkonzentration; vgl. letzte Spalte der Tab. 1). Offenbar ist in dieser Versuchsreihe nur für den Ansatz mit der kleinsten Labmenge (8 L.E.) Substratsättigung für das Ferment realisiert gewesen. Aber auch bei ihm wird die starke Abbiegung der logarithmischen Umsatzkurve beobachtet. Diese Abbiegung kann also nicht oder nur zum kleinen Teil auf Substratverarmung zurückgeführt werden. Es lag nicht in unserer Absicht, die Kinetik dieses Systems näher zu studieren. Wir haben deshalb nur noch festzu-

¹⁾ Nach Fertigstellung des Drucksatzes wurde noch festgestellt, dass das *Marshall*-Lab gegenüber Casein keine Phosphatasaktivität besitzt. Die Versuche wurden praktisch unter den gleichen Bedingungen und mit denselben Kontrollen durchgeführt, wie die in Tab. 9 und Fig. 2 wiedergegebenen. Durch dieses Ergebnis wird unsere Auffassung, dass das *Hansen*-Lab neben dem eigentlichen Labenzym zwei besondere Phosphatasen enthält, weiter gestützt. Von diesen beiden Fermenten scheint das *Marshall*-Lab nur das eine, nämlich die saure Phosphatase II zu enthalten.

²⁾ Hs. Nitschmann & R. Varin, loc. cit.

stellen versucht, ob das Ferment aus dem Pepton vielleicht überhaupt nur einen ganz bestimmten Teil des organisch gebundenen Phosphates abzuspalten vermag, so wie z. B. die Peptidbindungen im Casein für kristallisiertes Lab auch nur zum Teil angreifbar sind. Das scheint aber hier nicht zuzutreffen, wie der Versuch der Tab. 2 zeigt, bei dem die Konzentration des Substrates klein und die des Fermentes gross gewählt wurde. Aus äusseren Gründen konnte der Versuch nicht über 578 Stunden hinaus verfolgt werden. Die Phosphatabspaltung betrug nach dieser Zeit 78% und scheint noch nicht am Ende gewesen zu sein. Man darf daraus schliessen, dass im Pepton im Prinzip alle Phosphoesterbindungen spaltbar sind. Die Gerinnungsaktivität des zugesetzten Labes hatte am Ende der Inkubationszeit um ca. 25% abgenommen. Eine solche irreversible Schädigung des Labes ist auch sonst beobachtet worden (siehe z. B. noch Tab. 9, Spalte 4). Sie ist um so grösser, je höher das pH ist. Sie genügt aber nicht zur Erklärung der starken Verlangsamung der Spaltungsreaktion. Es scheint, dass das Ferment zudem durch Abbauprodukte, die aus der Proteolyse stammen dürften, gehemmt wird. Dass die einzelnen Esterbindungen im Phosphopepton an sich mit sehr verschiedenen Geschwindigkeiten reagieren, ist weniger wahrscheinlich, denn wir haben festgestellt, dass der Abbau mit 1-n. H_2SO_4 bei 100° sehr gut dem Gesetz für monomolekulare Reaktionen folgt.

In der Arbeit von *Hs. Nitschmann & R. Varin*¹⁾ musste die Frage offen gelassen werden, ob das kristallisierte Lab im Casein neben Peptidbindungen noch weitere Bindungen spaltet, die bei der Titration erfasst werden. Nachdem nun feststeht, dass kristallisiertes Lab aus Casein kein Phosphat in Freiheit setzt, sind die Möglichkeiten wesentlich eingeschränkt. Es wäre immer noch denkbar, dass Phosphorsäure im Casein in Diesterbindung vorhanden ist und Lab nur die eine der Esterbindungen löst (Phosphodiesterasewirkung). Etwas Ähnliches wäre möglich für Phosphorsäurediamid und Phosphorsäureesteramid-Gruppierungen. Solche zweifach gebundene Phosphatreste sind im Casein bisher allerdings noch nicht nachgewiesen worden. Es bleibt noch die Frage, ob Lab Säureamidbindungen des Asparagins und des Glutamins, die im Casein reichlich vorkommen, spaltet. Wir haben inzwischen in sorgfältigen Versuchsreihen festgestellt, dass weder kristallisiertes noch *Hansen*-Lab aus Natriumcaseinatlösungen bei pH 6,8 NH_3 abspaltet. Zwar werden immer Spuren von NH_3 frei, aber nie mehr als in den Kontrollversuchen ohne Lab²⁾.

Wir danken der Verwaltungskommission des *Theodor-Kocher-Institutes* der Universität Bern, dass sie es dem einen von uns (*H. M.*) mit Mitteln der *Rockefeller-Foundation* ermöglicht hat, als Guest am genannten Institut zu arbeiten.

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ Näheres über diese Versuche wird in der 1953 in Bern erscheinenden Dissertation von *P. Zahler* mitgeteilt.

SUMMARY.

The phosphatase activity of two technically prepared rennins and of crystallized rennin from *Berridge* was investigated. Casein, phosphopeptone from casein, and glycerophosphate were subjected to the action of these rennin preparations.

The pure crystallized rennin alone did not demonstrate any phosphatase activity on any of the three substrata at neutral or weakly acid pH. However, it was found that it could be activated by a heat resistant low molecular substance (not Mg-ion). After such activation, the pure rennin split off phosphoric acid from phosphopeptone but not from casein or glycerophosphate, the optimum conditions lying in the pH range of 5 to 6. This activity is not inhibited by fluoride. The activator occurs in the ultrafiltrate of milk and of a rennin from *Hansen*. This *Hansen* rennin was found to possess phosphatase activity for all three substrata. There are reasons to assume that it contains two individual phosphatases, namely acid phosphomonoesterase II and phosphoprotein phosphatase. A rennin from *Marshall* showed activity on phosphopeptone only after activation. It too contains a phosphatase which is active on glycerophosphate. Against casein, however, it is inactive. Finally it was shown that neither the crystallized nor the technical rennins can split off NH_3 from casein. The breakdown of casein due to the action of crystallized rennin which was previously carried out and titrimetrically followed is discussed in the light of this newly gained information.

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

249. Berechnung der Elektronenverteilung auf Grund von kanonischen Reihen

von O. Klement.

(25. VIII. 52.)

Bei der Berechnung der Elektronenverteilung des Fulvens¹⁾ haben wir kürzlich auch sogenannte kanonische Reihen verwendet. Da dieser Begriff in dem von uns verwendeten *Heitler-Rumer*-Verfahren²⁾ bisher sonst nicht zur Anwendung kam, möchten wir in dieser Mitteilung zeigen, dass sie auch für die Berechnung der Elektronenverteilung von Nutzen sein können.

¹⁾ O. Klement, Helv. 35, 1676 (1952).

²⁾ O. Klement, Helv. 34, 1368 (1951) (im folgenden mit (I) bezeichnet).