

Zusammenfassung.

Aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces narbonensis* n. sp. wurde ein neues lipophiles kristallines basisches Antibioticum $C_{28}H_{47}O_7N$, das Narbomycin, isoliert.

Narbomycin gibt bei der sauren Hydrolyse das Desosamin (I), welches auch bei der Hydrolyse von Pikromycin und Erythromycin erhalten worden war. Der durch das Desosamin nicht erfasste Rest des Narbomycins besitzt wahrscheinlich einen terpenoiden Charakter.

Forschungslaboratorien der CIBA
Aktiengesellschaft in Basel.
Institut für spezielle Botanik und
Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

107. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch.
IX. Über die Abspaltung von Nicht-Protein-Stickstoff (NPN)
aus isoliertem α - und β -Casein durch Lab¹⁾

von Hs. Nitschmann und W. Keller.

(26. IV. 55.)

*Alais, Mocquot, Nitschmann & Zahler*²⁾ haben gezeigt, dass bei der Einwirkung von Lab auf Milch oder Caseinlösungen Proteinbruchstücke abgespalten werden, die in Trichloressigsäure im Gegensatz zu Casein löslich sind. Wenn man die Bildung dieses Nicht-Protein-Stickstoffes (NPN) quantitativ verfolgt und die Werte gegen die Zeit aufträgt, erhält man sehr typische Kurven, die deutlich zwei sich überlagernde Spaltungsreaktionen erkennen lassen. Die eine verläuft anfangs sehr rasch und kommt meist vor dem Eintritt der Gerinnung zum Ende. Die andere verläuft viel langsamer, führt aber schliesslich viel weiter, weshalb sie im untersuchten Zeitintervall einen linearen Kurvenverlauf zeigt. Es wurde vermutet, dass die erste Reaktion nichts anderes als die eigentliche Primärreaktion der Labgerinnung der Milch ist. Diese Annahme wurde durch Abbaubersuche von *Mattenheimer & Nitschmann*³⁾ an Casein mit anderen, teils gerinnungsaktiven, teils nicht aktiven Proteasen gestützt. Da – wie *Cherbuliez & Baudet*⁴⁾ gezeigt haben – die α -Fraktion des Caseins

¹⁾ Nr. VIII dieser Reihe: *H. Mattenheimer & Hs. Nitschmann*, Helv. **38**, 687 (1955).

²⁾ *Ch. Alais, G. Mocquot, Hs. Nitschmann & P. Zahler*, Helv. **36**, 1955 (1953).

³⁾ *H. Mattenheimer & Hs. Nitschmann*, l. c.

⁴⁾ *E. Cherbuliez & P. Baudet*, Helv. **33**, 1673 (1950).

für die Gerinnung der Milch bei der Labung verantwortlich ist, müsste man die spezifische NPN-Abspaltung, wenn sie mit der Primärreaktion identisch ist, auch in Lösungen von isoliertem α -Casein finden. In der Arbeit Nr. VII dieser Reihe (*Alais et al.*) wurde schon auf Versuche von *Keller* hingewiesen, welche diese Erwartung bestätigt hatten. Über diese Untersuchungen soll im folgenden kurz berichtet werden¹⁾.

Methodisches.

α - und β -Casein wurden aus frischem, dreimal umgefälltem Säurecasein (Kuh) nach der Harnstoff-Methode von *Hipp, Groves, Custer & McMeekin*²⁾ gewonnen. Das α -Casein erwies sich als elektrophoretisch rein. Vom β -Casein wurden 2 Präparate erhalten, von denen das eine einheitlich war, während das zweite noch 30% α -Casein enthielt. Die Ausbeute an γ -Casein war für Abbauprobe zu klein. Die Caseinlösungen wurden in der üblichen Weise durch langsamen Zusatz der nötigen Menge NaOH zur Caseinsuspension hergestellt.

Das von uns verwendete Lab war dasselbe, von *N. J. Berridge* kristallisierte Präparat, mit dem schon *Alais, Mocquot, Nitschmann & Zahler* (loc. cit.) gearbeitet hatten.

Die Aktivität der Lablösungen wurde mit Hilfe der Gerinnungszeit frischer Magermilch bei 25° kontrolliert³⁾. Ein Teil einer Lablösung mit 20 γ N pro cm³ ergab mit 4 Teilen Milch eine Zeit von durchschnittlich 13 Min.

Die Abbauprobe an den Caseinfraktionen wurden ebenfalls bei 25° \pm 0,05° durchgeführt:

Auf 25° vorgewärmte Caseinatlösung und Lablösung werden im Verhältnis 4:1 gemischt und in den Thermostaten gestellt. Zu verschiedenen Zeiten werden Teile des Ansatzes mit dem doppelten Volumen 18-proz. Trichloressigsäurelösung (TCE-Konzentration in der Mischung 12%) versetzt. Nach 10 Min. Stehen bei Zimmertemperatur⁴⁾ wird durch Papier oder feinporige Glasfilter klar filtriert. Mit aliquoten Teilen des Filtrates wird eine doppelte Stickstoffbestimmung ausgeführt. Der Aufschluss geschah nach *Boissonas & Haselbach*⁵⁾ in Pyrexreagensgläsern. Wir arbeiteten aber nicht mit Ninhydrin, sondern mit *Nessler*-Reagens und massen die Absorption bei $\lambda = 402 \text{ m}\mu$ mit einem *Beckman*-Spektrophotometer Modell B.

Abbau-Kurven von α - und β -Casein.

In Fig. 1 sind die unter annähernd gleichen Bedingungen erhaltenen NPN/Zeit-Kurven für reines α -Casein, reines β -Casein und β -Casein mit 30% α -Casein zusammengestellt.

Die Kurve des α -Caseins, die übrigens in vielen Wiederholungen und auch mit anderen α -Caseinpräparaten immer wieder ähnlich gefunden wurde, gleicht sehr den Abbaukurven, die *Alais, Mocquot, Nitschmann & Zahler* (loc. cit.) mit Milch und Na-Caseinatlösungen erhalten haben. Die rasch verlaufende Primärreaktion und die lang-

¹⁾ Für eine ausführliche Darstellung siehe *W. Keller*, Die Abspaltung von Peptiden aus reinen Caseinfraktionen durch kristallisiertes Lab. Diss. Bern 1954.

²⁾ *H. J. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer & T. L. McMeekin*, *J. Dairy Science* **35**, 272 (1952).

³⁾ Bei 25° ist die Gerinnungszeit allerdings nicht mehr umgekehrt proportional zur Labmenge.

⁴⁾ Die natürlichen Schwankungen der Zimmertemperatur haben keinen merklichen Einfluss auf die NPN-Werte.

⁵⁾ *R. A. Boissonas & Ch. Haselbach*, *Helv.* **36**, 576 (1953).

same, unspezifische Proteolyse (linearer Kurventeil) heben sich deutlich voneinander ab. Die maximale Menge NPN, die durch die Primärreaktion allein abgespalten wird, beträgt etwa 1% des gesamten Proteinstickstoffes und ist damit etwas geringer, als sie gewöhnlich

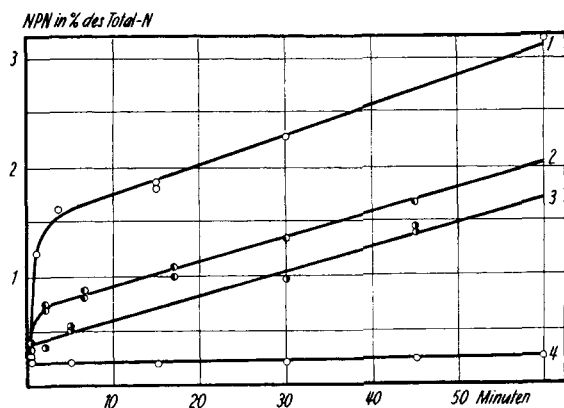


Fig. 1.

Konzentrationen im Ansatz:

1,6—1,8% Casein, krist. Lab entsprechend 4 γ N pro cm^3 (bringt in gleicher Konzentration Magermilch bei 25° in 11—13 Min. zur Gerinnung). pH 6,6; 25°.

Kurve 1: α -Casein,

2: β -Casein mit 30% α -Casein,

3: reines β -Casein,

4: Kontrollversuch mit α -Casein und durch Hitze inaktiviertem Lab.

bei Milch und bei Lösungen des gesamten Caseins gefunden wird (ca. 1,5%). Bei anderen α -Caseinpräparaten haben wir auch höhere Werte gefunden (bis ca. 3%). Solche Schwankungen der maximalen Menge des durch die Primärreaktion abgetrennten NPN wurden übrigens früher schon bei Milch und Lösungen von Gesamtcasein beobachtet. Sie sind zum Teil stofflich bedingt, ohne dass wir sagen könnten, wie sie zustande kommen. Der Wert ist aber auch bei ein und demselben Casein von den Reaktionsbedingungen bei der Labung nicht ganz unabhängig. Über diesbezügliche Beobachtung an Lösungen von nichtfraktioniertem Casein soll in anderem Zusammenhang berichtet werden.

β -Casein gibt eine von Anfang an linear ansteigende NPN-Zeit-Kurve, ist also nur der unspezifischen Proteolyse unterworfen, während die für das α -Casein typische Primärreaktion fehlt. Die Kurve des α -haltigen β -Caseins zeigt anfangs einen kleinen, diesem Gehalte entsprechenden Sprung.

Die unspezifische Proteolyse verläuft – soweit sie sich in den NPN-Werten zu erkennen gibt – bei α -Casein und bei β -Casein ungefähr gleich schnell. Sie ist ein reiner Lab-Effekt; die Protease der Milch, von der sich ja immer etwas im Gesamtcasein findet, ist hier

nicht merklich beteiligt, wie die absolut flache Kontrollkurve (Nr. 4 in Fig. 1) für α -Casein mit durch Hitze inaktiviertem Lab zeigt.

Die Steilheit des geradlinigen Kurventeils, d. h. die Geschwindigkeit der unspezifischen Proteolyse ist beim α -Casein nicht nur von der Labkonzentration, sondern bei konstanter Labkonzentration auch von der Substratkonzentration abhängig. Überraschenderweise verläuft die Reaktion um so rascher, je geringer die Substratkonzentration ist. Dies kommt besonders deutlich zum Ausdruck in den Kurven der Fig. 2, wo für Abbauversuche mit verschiedener Substratkonzentration der N-Gehalt der Trichloressigsäurefiltrate in mg pro cm^3 gegen die Zeit aufgetragen wurde.

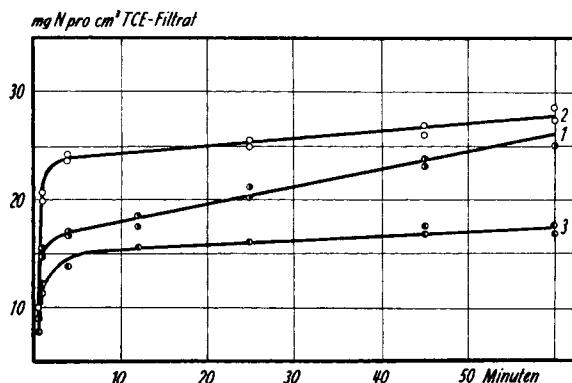


Fig. 2.

Kurve 1: α -Casein-Konzentration im Ansatz 1,2%.

2: α -Casein-Konzentration 2,4%.

3: α -Casein-Konzentration während der Fermentierung 2,4%. Unmittelbar vor jeder TCE-Fällung wurde auf das doppelte Volumen mit H_2O verdünnt, so dass die Casein-Konzentration für die Fällung nur noch 1,2% wie bei 1 betrug.

Alle übrigen Bedingungen gleich wie bei den Versuchen der Fig. 1.

Der Vergleich von Kurve 1 mit Kurve 2 zeigt, dass im linearen Kurventeil die NPN-Zunahme pro Zeit für die 1,2-proz. α -Caseinat-lösung wesentlich grösser ist als für die 2,4-proz. Lösung. Bei Kurve 3 war die Casein-Konzentration während des Abbaus 2,4%. Dicht vor der TCE-Fällung wurde aber noch auf 1,2% verdünnt. Das lineare Kurvenstück wird dadurch nicht steil wie bei 1, d. h. der Einfluss der Caseinkonzentration betrifft wirklich die Labaktivität und ist nicht etwa durch die höhere Verdünnung bei der TCE-Fällung vorge-täuscht.

Der beobachtete Effekt kann auf einer Fermenthemmung durch Substratüberschuss, wie sie ja von einigen anderen Enzymen her bekannt ist, beruhen, oder darauf, dass das Substrat in der verdünnten Lösung qualitativ nicht ganz dasselbe ist wie in konzentrierter Lösung. Es ist lange bekannt, dass Casein in seinen Lö-

sungen zur Assoziation neigt, wobei der Assoziationsgrad von den Bedingungen wie Konzentration, Salzgehalt und pH abhängt. Erst kürzlich hat *Hawler*¹⁾ mit Streulichtmessungen diese Assoziations-tendenz auch bei Lösungen von isoliertem α - und β -Casein nachgewiesen. Es ist nun sehr wohl möglich, dass grössere Teilchen, die bei höheren Caseinkonzentrationen im Assoziationsgleichgewicht bevorzugt sind, dem Abbau durch das Lab weniger zugänglich sind als kleinere Teilchen. Bei der Zusammenlagerung der Molekeln werden vielleicht auch spaltbare Gruppen direkt abgedeckt.

SUMMARY.

During the action of crystalline rennin on solutions of α -casein, Non Protein Nitrogen (NPN) soluble in 12 % trichloroacetic acid is split off. The NPN/time curves greatly resemble the ones obtained by *Alais*, *Mocquot*, *Nitschmann* & *Zahler* for whole casein. Both primary reaction and general proteolysis are clearly recognizable. β -casein under the same conditions shows only the general proteolysis (straight NPN/time curve). As is known, the α -casein alone is responsible for the curdling of milk under the action of rennet. These results, therefore, support the assumption that the specific splitting reaction, which sets free a small amount of NPN very quickly, is directly responsible for the milk clotting.

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

108. Über den Einfluss von Salzzusätzen auf das Dampf-Flüssigkeits-Gleichgewicht wässriger Ameisensäure

von A. Guyer, A. Guyer jr. und B. Karth Johnsen.

(27. IV. 55.)

Für die destillative Trennung zweier Stoffe, die ein azeotropes Gemisch bilden oder bei denen die Lage der Gleichgewichtskurve die destillative Separierung erschwert, wird oft der Zusatz einer chemisch indifferenten, dritten flüssigen Komponente empfohlen. Es ist auch schon gezeigt worden, dass mittels löslicher Salzzusätze ganz ähnliche Wirkungen erzielt werden können.

So haben *Garwin* & *Hutchinson*²⁾ die Einwirkung von Calciumchlorid auf die relative Flüchtigkeit des Systems Essigsäure-Wasser untersucht, wodurch diejenige des Wassers so stark erniedrigt wird, dass nicht wie üblich Wasser, sondern reine Säure als Destillat

¹⁾ *M. Hawler*, Arch. Biochem. Biophys. **51**, 79 (1954).

²⁾ *L. Garwin* & *K. Hutchinson*, Ind. Eng. Chem. **42**, 727 (1950).