

mischung, wurden zu 32 g 85-proz. Phosphorsäure unter Rühren 9,07 g Dien (XXXII und/oder XXXIII) innert 20 Min. getropft, wobei die Temperatur unter  $-10^{\circ}$  blieb. Die zähe gelbe Paste wurde 15 Min. weiter bei  $-15^{\circ}$  bis  $-10^{\circ}$  gerührt, innert 15 Min. auf Raumtemperatur gebracht und anschliessend 15 Min. bei  $50-60^{\circ}$  gerührt. Nach Zusatz von Eiswasser wurde ausgeäthert, die Ätherlösung mit Wasser und Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen, getrocknet und eingengt: Rückstand 8,79 g grünliches Öl. Die Destillation ergab etwas harzigen Rückstand. Bei der zweiten Destillation erhielt man 7,29 g vom Sdp.  $163-165^{\circ}/12$  mm;  $n_D^{20}$  1,5062.

$C_{16}H_{26}O$  Ber. C 81,99 H 11,18  $-OCH_3$  13,24%  
(234,37) Gef. „ 81,87 „ 11,38 „ 13,14% DZ 1,55

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. H. Lehner) ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Die Synthese von substituierten, 2fach ungesättigten sym-Biscyclohexyl-äthanen wird beschrieben.

Dr. A. Wander AG., Bern, Forschungsinstitut.  
Leiter: PD. Dr. med. G. Schönholzer.

## 233. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. X<sup>1)</sup>. Eine Methode zur direkten Bestimmung der Geschwindigkeit der Primärreaktion der Labgerinnung der Milch<sup>2)</sup>

von Hs. Nitschmann und H. U. Bohren.

(12. X. 55.)

### 1. Einleitung.

Die Reaktionsgeschwindigkeitsmessungen der enzymatischen Phase (Primärreaktion) der Labgerinnung der Milch, über die hier berichtet wird, beruhen auf der Tatsache, dass bei dieser Reaktion in spezifischer Weise Peptide vom Casein abgespalten werden, die viel löslicher als das Casein sind und deshalb relativ leicht von diesem abgetrennt werden können. Dass bei der Labung leichter lösliche Stickstoffverbindungen auftreten, ist schon sehr lange bekannt (Molkenalbumose), aber erst kürzlich ist der Versuch gemacht worden, die Entstehung dieses Nicht-Protein-Stickstoffes (NPN) zeitlich messend zu verfolgen<sup>3)</sup>. Das kann dadurch geschehen, dass man während der Labung von Milch oder Caseinlösung von Zeit zu Zeit

<sup>1)</sup> Nr. IX dieser Reihe: Hs. Nitschmann & W. Keller, *Helv.* **38**, 942 (1955).

<sup>2)</sup> Unter dem Titel „Kinetic measurements of the primary reaction of the rennet curdling of milk“ in gekürzter Form vorgetragen am 3. Internationalen Kongress für Biochemie, 1.—6. August 1955 in Brüssel. — Für eine noch detailliertere Darstellung siehe Diss. H. U. Bohren, Bern 1955.

<sup>3)</sup> Ch. Alais, G. Mocquot, Hs. Nitschmann & P. Zahler, *Helv.* **36**, 1955 (1953).

den in Trichloressigsäure löslichen Stickstoff bestimmt. Die so erfassbare Spaltungsreaktion kommt sehr bald zum Abschluss, und weiterer NPN wird dann nur noch in ausserordentlich langsamer Reaktion durch eine allgemeine, unspezifische Proteolyse gebildet.

Mit *W. Keller* konnte gezeigt werden<sup>1)</sup>, dass die Peptide der Primärreaktion nur vom  $\alpha$ -Casein stammen, welches schon früher von *Cherbuliez & Baudet*<sup>2)</sup> als verantwortlich für die Gerinnung der Milch erkannt worden ist. Diese Versuche, zusammen mit weiteren von *Mattenheimer*<sup>3)</sup> über die Wirkung anderer proteolytischer Fermente auf das Casein, lassen keinen Zweifel daran, dass die rasche anfängliche Peptidabspaltung wirklich die die Gerinnung auslösende Reaktion ist und nicht nur eine insignifikante Begleiterscheinung. Hier bietet sich somit die Möglichkeit, die Geschwindigkeit der Primärreaktion direkt und losgelöst vom Gerinnungsvorgang zu bestimmen, was bisher nicht möglich gewesen ist. Wir haben versucht, besonders den ersten, steil ansteigenden Teil der Spaltungskurven (NPN aufgetragen gegen die Zeit) möglichst genau aufzunehmen, um aus ihm Reaktionsgeschwindigkeits-Konstanten ermitteln zu können. Es wird im folgenden gezeigt, dass dies tatsächlich möglich ist und dass man mit dieser Technik den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Geschwindigkeit der Primärreaktion untersuchen kann.

## 2. Methodisches.

**Ferment:** Alle Versuche wurden mit dem kristallisierten Lab (Geschenk von *N. J. Berridge*, Reading, England) durchgeführt, das schon in den vorhergehenden Arbeiten dieser Publikationsreihe verwendet und durch den einen von uns mit *Schwander & Zahler*<sup>4)</sup> näher charakterisiert worden ist. Das Lab wurde jeweils in destilliertem Wasser gelöst und die Lösungen mit etwas Thymol im Kühlraum aufbewahrt. Um ein Mass für die wirksame Fermentmenge zu haben, wurde neben dem N-Gehalt die Milchgerinnungsaktivität bei 25° bestimmt, bei welcher Temperatur die meisten Abbauversuche durchgeführt wurden. Da die Gerinnungszeit hier nicht umgekehrt proportional der Labmenge geht, muss eine Eichkurve aufgenommen werden.

**Substrat:** Das verwendete Casein wurde wie früher aus frischer Misch-Magermilch durch Fällung mit HCl und dreimaliges Umfällen aus neutraler Lösung (Na-Caseinat) gewonnen. Zwischen dem ersten und dem zweiten Umfällen wurde das abgepresste Casein über Nacht unter 50-proz. Alkohol stehengelassen, um das der Milch eigene proteolytische Enzym zu inaktivieren<sup>5)</sup>. Trotzdem schien das Casein Spuren von proteolytischer Aktivität zu enthalten, denn die NPN/Zeit-Kurven mit Lab zeigten nach dem anfänglichen steilen Sprung ein ganz leicht ansteigendes Plateau, das aber horizontal wurde, wenn wir die Na-Caseinatlösung (pH 6,7) vor dem Versuch 10 Min. auf 80° erhitzen. Auch die Kontrollkurven (Na-Caseinat ohne Lab) verliefen erst nach dieser Wärmebehandlung absolut parallel der Zeit-Achse. Wir haben deshalb die Na-Caseinat-Stammlösung immer zuerst durch derartiges Erwärmen von begleitender Protease befreit. Dass das Casein durch dieses Erhitzen denaturiert und dabei in seinem Verhalten gegen das Lab entscheidend verändert werden könnte, glauben wir aus folgenden Gründen verneinen zu können:

<sup>1)</sup> *Hs. Nitschmann & W. Keller*, *Helv.* **38**, 942 (1955).

<sup>2)</sup> *E. Cherbuliez & P. Baudet*, *Helv.* **33**, 1673 (1950).

<sup>3)</sup> *H. Mattenheimer & Hs. Nitschmann*, *Helv.* **38**, 687 (1955).

<sup>4)</sup> *H. Schwander, P. Zahler & Hs. Nitschmann*, *Helv.* **35**, 553 (1952).

<sup>5)</sup> *R. C. Warner*, *J. Amer. chem. Soc.* **67**, 531 (1945).

Die Abbaukurven erhitzter und nicht erhitzter Na-Caseinatlösung verlaufen — abgesehen von dem schon erwähnten Unterschied — ausserordentlich ähnlich. Weiter wurden das UV.-Absorptionsspektrum, die optische Drehung und der Gehalt an freien  $\text{NH}_4$ -Ionen (Säureamidspaltung) vor und nach dem Erhitzen genau gleich gefunden.

Papierelektrophoresen (mit *Michaelis*-Puffer pH 7,35 bei 1° ausgeführt) sind vor und nach Erhitzen vollkommen identisch. Man erkennt  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein (kein  $\gamma$ !), und nach der Labung erscheinen bei beiden Lösungen noch zwei sehr deutlich abgesetzte Streifen, die nach der Kathode zu wandern scheinen<sup>1)</sup>.

Die relative Viskosität (nach Zusatz von 0,15-n. KCl im *Ostwald*-Viskosimeter bei 20° bestimmt) ist direkt nach dem Erhitzen allerdings merklich kleiner (1,645 gegenüber 1,798), doch nähern sich die Werte im Laufe von einigen Std. wieder einander. Es handelt sich also hier offenbar um eine reversible Verschiebung der Assoziationsverhältnisse, die zwischen den Caseinmolekeln in Lösung herrschen.

Schliesslich sei auch noch darauf hingewiesen, dass *Hipp* et al.<sup>2)</sup> bei Caseinfraktionen, die sehr hohen Harnstoffkonzentrationen ausgesetzt waren, ebenfalls keine Anzeichen für eine Denaturierung finden konnten.

Die Na-Caseinat-Stammlösungen müssen ein etwas tieferes pH aufweisen, als in der Mischung gewünscht wird, da das pH beim Verdünnen etwas ansteigt. Beim Versetzen von 4 Teilen 3,5-proz. Na-Caseinatlösung mit 1 Teil Lablösung stieg das pH z.B. von 6,5 auf 6,7. Lösungen mit pH zwischen 6,5 und 5,5 wurden mit einer entsprechend kleineren Menge NaOH hergestellt. Kleine Korrekturen nach unten wurden mit HCl vorgenommen. Die in diesem Falle gebildete Menge NaCl war so gering (Bruchteile eines Promills), dass sie die Aktivität des Lauges nicht beeinflussen konnte.

Zur Herstellung von Caseinlösungen mit pH unter dem isoelektrischen Punkt (2,0—3,5) wurde die nötige Menge Casein mit NaOH gelöst und dann mit HCl isoelektrisch gefällt und ausgewaschen. Der nasse Niederschlag lässt sich nun mit HCl leicht als Caseinhydrochlorid in Lösung bringen. Kleine pH-Korrekturen wurden hier, wenn nötig, mit ein wenig NaOH durchgeführt.

Die Caseinlösungen wurden nicht besonders gepuffert. Die Pufferkapazität des Proteins selber genügt, um das pH während eines Versuches innerhalb sehr enger Grenzen konstant zu halten.

Versuchsführung: 4 Teile Substrat- und 1 Teil Enzymlösung werden im Thermostaten auf die gewünschte Temperatur gebracht und dann gemischt. In bestimmten Zeitabständen werden der Mischung Teile entnommen und sofort (Zeitmessung) zu einem doppelten Volumen 18-proz. HCl-freier Trichloressigsäure (TCE) gegeben, z.B. 2 cm<sup>3</sup> zu 4 cm<sup>3</sup> TCE, und gut geschüttelt. Die TCE-Konzentration in der Mischung betrug also, wo nichts anderes angegeben, 12%. Die Fällungstemperatur war stets etwa 20°, doch haben wir nachgewiesen, dass Schwankungen von  $\pm 5^\circ$  keinen merklichen Einfluss auf die N-Gehalte der TCE-Filtrate hatten. Der Niederschlag wurde nach 10-minütigem Stehen abfiltriert. Im Filtrat wurde alsdann der Stickstoff bestimmt.

Der Nullwert, d.h. der NPN-Wert der Reaktionsmischung zur Zeit Null, wurde so festgestellt, dass zu 4 Teilen TCE zuerst 1,6 Teile Substratlösung und dann 0,4 Teile Lablösung zugesetzt wurden. Alles übrige gleich.

Jede Versuchsreihe wurde doppelt ausgeführt, ebenso die einzelnen N-Bestimmungen jeder Reihe.

Stickstoffbestimmungen: Die Aufschlüsse wurden ganz ähnlich, wie *Boissonas* & *Haselbach*<sup>3)</sup> es beschrieben haben, durchgeführt.

<sup>1)</sup> Diese beiden neuen Streifen (Peptide) werden bei der üblichen Färbetechnik ausgewaschen und deshalb nur gefunden, wenn die Streifen mit Ninhydrin-Spray (wie Papierchromatogramme) entwickelt werden. — Über die elektrophoretische und chromatographische Untersuchung der abgetrennten Peptide wird später berichtet werden.

<sup>2)</sup> *N. J. Hipp, M. L. Groves & T. L. McMeekin*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 4822 (1952).

<sup>3)</sup> *R. A. Boissonas & Ch. Haselbach*, Helv. **36**, 576 (1953).

Mit Hilfe einer handelsüblichen elektrischen Heizplatte konnten auf einmal 30 Proben (bis 1 cm<sup>3</sup> TCE-Filtrat mit 1–20  $\gamma$  N) in Jenaer Reagensgläsern<sup>1)</sup> aufgeschlossen werden. Die Proben wurden jede in ihrem Reagensglas kolorimetrisch auf NH<sub>3</sub> analysiert.

Während wir uns für die Aufschlussbedingungen genau an *Boissonas & Haselbach* hielten, bestimmten wir das NH<sub>3</sub> statt mit Ninhydrin-Hydrindantin mit *Nessler*-Reagens. Dadurch wird die Methode noch einfacher und rascher. Wir erhielten sehr gut reproduzierbare Resultate (Fehlerbreite max.  $\pm 4\%$ ) und eine absolut geradlinige Eichkurve (optische Dichte aufgetragen gegen die NH<sub>3</sub>-Menge) bei folgender Arbeitsweise:

Nach Aufschluss abgekühlte Proben mit 5 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O verdünnen, unter Vermeidung von Flüssigkeitsverlusten umschwenken und mit 2 cm<sup>3</sup> *Nessler*-Reagens versetzen. Nach völliger Durchmischung sofort, spätestens aber nach 20 Min., im „kleinen“ *Beckman*-Spektrophotometer (Modell B) bei 402 m $\mu$  (Absorptionsmaximum) kolorimetrieren.

*Nessler*-Reagens: 42 g KJ und 31,5 g Jod in 28 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O lösen. Wenn gelöst, 42 g Hg zugeben und schütteln (unter Kühlung) bis Farbe gelb-orange. Einstellen der Lösung durch tropfenweises Zugeben von KJ/J<sub>2</sub>-Lösung (0,32 g J<sub>2</sub> + 0,44 g KJ in 100 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O), bis 2 Tropfen der Lösung, zu 4 Tropfen 1-proz. Stärkelösung gegeben, gerade Blaufärbung ergeben. Die Lösung ist dann braungelb. Mit H<sub>2</sub>O auf 280 cm<sup>3</sup> verdünnen und zu einer Lösung von 142 g NaOH in 1220 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O geben. Eine Woche stehenlassen. Filtrieren und zur Verhinderung von Kristallausscheidungen 4 g NaJ zugeben.

Auswertung der NPN/Zeit-Kurven: Die Mittelwerte der doppelten N-Bestimmungen wurden jeweils für die beiden parallelen Abbauprobversuche in ein und dasselbe Diagramm eingezeichnet. Bei guter Übereinstimmung wurde eine Kurve so gezogen, dass die Punkte von dieser Kurve möglichst wenig weit weg und vor allem zu beiden Seiten lagen. Für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden diese gezogenen Kurven verwendet. Nun wurde  $\log [a/(a-x)]$  (worin  $a$  die maximale NPN-Zunahme und  $x$  die NPN-Zunahme zur Zeit  $t$  bedeutet) für eine Reihe von Punkten dieser Kurve gegen die Zeit aufgetragen. Die Punkte liegen meist recht gut auf einer Geraden, die durch den Nullpunkt geht. Die Abbaukurven verlaufen also in diesen Fällen wie bei einer Reaktion 1. Ordnung. Das beweist nicht, dass die Reaktionskinetik wirklich so einfach ist, aber wenn die Kurven durch die Gleichung  $k = 1/t \cdot \ln [a/(a-x)]^2$  beschrieben werden können, so darf man wohl für vergleichende Messungen, wie wir sie vorhatten,  $k$  als Reaktionsgeschwindigkeitskonstante betrachten. Die sonst für die Bestimmung von Fermentaktivitäten übliche Methode der Messung des Umsatzes pro Zeiteinheit im Gebiete, wo der Umsatz noch proportional der Zeit verläuft, kann hier nicht angewandt werden, da die Messungen in diesem Gebiete noch zu ungenau sind.

### 3. Die Versuche.

a) Einfluss der Trichloressigsäurekonzentration bei der Deproteinisierung auf die Grösse der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. *Alais, Mocquot, Nitschmann & Zahler* (l. c.) haben gezeigt, dass bei Verwendung von nur 2% TCE zur Fällung der gelabten Ansätze wesentlich mehr NPN in Lösung bleibt als bei 12%. Sie haben auch darauf hingewiesen, dass 12% TCE eine Fraktionierung der NPN-Verbindungen bewirkt und dass der lösliche Anteil relativ einheitlich erscheint, während das Total des in 2% TCE löslichen NPN's sicher heterogen ist. Wir haben deshalb am selben Abbauprobversuch zwei Umsatz/Zeit-Kurven (s. Fig. 1) aufgenommen, die eine mit 2% und die andere mit 12% TCE bei der Fällung.

<sup>1)</sup> Nach gleicher optischer Dichte ausgesucht.

<sup>2)</sup> Wo im Text für  $k$  Zahlenwerte angegeben sind, wurde für die Berechnung  $t$  in Sekunden,  $a$  und  $x$  in % NPN bezogen auf den Gesamt-N, und  $\ln$  (nicht  $\log$ ) eingesetzt.

Bedingungen: Casein in der Mischung: 2,0%; Labkonz. in der Mischung: 0,08 g N/cm<sup>3</sup>; pH: 6,7; Temp. 30°; NPN-Nullwerte für 2% TCE: 0,4%; für 12% TCE: 0,35%.

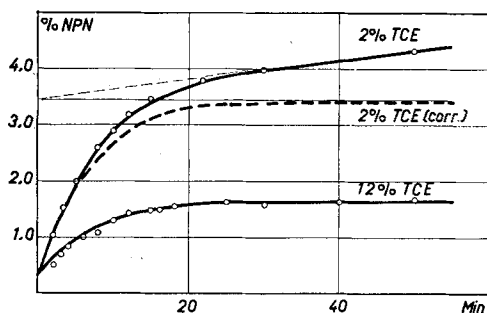


Fig. 1.

Einfluss der Trichloressigsäure-Konzentration auf den Verlauf der Abbaukurven.

Wie schon *Alais et al.* gefunden haben, erhält man mit 2% TCE kein horizontales Plateau. Im Gegensatz zum 12%-TCE-Versuch kommt hier die unspezifische Proteolyse im geradlinig ansteigenden Kurventeil deutlich zum Ausdruck. Verlängert man ihn rückwärts bis zum Schnittpunkt mit der Ordinate, so gibt diese Gerade den ganzen Verlauf der unspezifischen Proteolyse wieder, die sich der Primärreaktion überlagert. Durch Abziehen der NPN-Beträge, die der Ersteren zuzuschreiben sind, von der gefundenen Summationskurve erhält man eine korrigierte Kurve (gestrichelt), welche die Primärreaktion allein zum Ausdruck bringt. Die *k*-Werte über die Zeit für diese Kurve sowie für die Kurve mit 12%-TCE sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Zeit (Min.)	3	4	7	10	12	15
2% TCE	2,12	2,18	2,22	2,24	2,34	$2,48 \cdot 10^{-3}$
12% TCE	2,10	2,15	2,10	2,15	2,13	$2,20 \cdot 10^{-3}$

Die Konstanz ist befriedigend und man kann feststellen, dass in beiden Fällen innerhalb der Fehlergrenze dieselbe Reaktionsgeschwindigkeitskonstante herauskommt. Wir möchten vorläufig nur darauf hinweisen, dass diese interessante Tatsache die Möglichkeit eröffnet, bei Reaktionsgeschwindigkeitsstudien der Primärreaktion die Deproteinisierung auch mit 2% TCE vorzunehmen. Trotzdem mit 2% TCE die NPN-Werte im Verhältnis zum Gesamt-N grösser sind, was günstig wäre, haben wir im weiteren mit 12% TCE gear-

<sup>1)</sup> Diese Konzentration bringt frische Magermilch bei 25° in ca. 25 Min. zur Gerinnung.

beitet, weil dann die Kurven mit ihren horizontalen Plateaus nicht korrigiert werden müssen. Ob diese Technik wirklich die bessere ist, bleibt aber abzuklären.

### b) Einfluss der Labkonzentration.

Bedingungen: Casein in der Mischung: 2,0%; Labkonz. in der Mischung: 0,1; 0,2; 0,8<sup>1)</sup>; 1,6; 3,2  $\gamma$  N/cm<sup>3</sup>; pH: 6,7; Temp. 25°; NPN-Nullwert: 0,34%.

Die 5 Abbaukurven sind in Fig. 2 nach steigender Labkonzentration von 1–5 numeriert wiedergegeben.

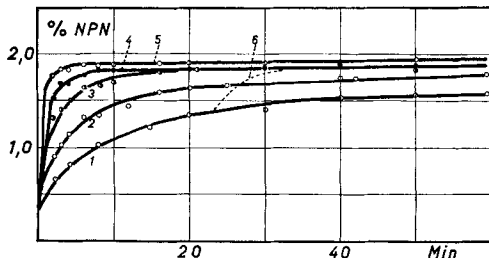


Fig. 2.

Einfluss der Labkonzentration.

Bei Labkonzentrationen über 0,8  $\gamma$  N/cm<sup>3</sup> ist der NPN-Endwert bei praktisch vollkommen ebenem Plateau überall gleich; die Geschwindigkeit, mit der er erreicht wird, ist aber stark konzentrationsabhängig.

Bei Labgehalten unter 0,8  $\gamma$  N/cm<sup>3</sup> tritt eine Senkung des Plateaus in Erscheinung, d. h. der maximale NPN-Wert der vorherigen Versuche wird nicht mehr erreicht.

Die reaktionskinetische Auswertung der Kurven stösst hier auf Schwierigkeiten. Bei den grossen Labdosen verläuft die Reaktion so rasch, dass die Kurven wegen zu grosser Ungenauigkeit der Zeitmessung nicht quantitativ ausgewertet werden können. Bei kleineren Labdosen verläuft die Reaktion wohl genügend langsam, aber man ist wegen der Plateausenkung im Zweifel, was man als maximalen NPN-Endwert einsetzen soll. Berechnet man für die Kurven 1 bis 3 die  $k$  unter Verwendung ein und desselben Endwertes (Plateau der Kurve 3), so findet man einen ziemlich starken Abfall mit der Zeit. (Für die Labkonzentration 0,2  $\gamma$  N/cm<sup>3</sup> z. B. sinkt  $k$  von 0,0027 bei 4 Min. auf 0,0017 bei 15 Min.) Berechnet man die  $k$ -Werte für die Kurven 1 und 2 mit ihren individuellen NPN-Endwerten (60-Min.-Werte) so wird die zeitliche Konstanz besser, aber die Werte können nun nicht mehr ohne weiteres miteinander verglichen werden, weil vom einen zum anderen Versuch mehr als eine Grösse verändert wird.

In den Kurven 1 und 2 der Fig. 2 kommt offenbar eine Hemmung des Labes durch Reaktionsprodukte oder vielleicht sogar eine irreversible Schädigung zum Ausdruck. Wir haben in einem Abbauversuch mit 0,1  $\gamma$  Lab-N/cm<sup>3</sup> (Kurve 1) nach 25 Min. die Konzentration

auf  $0,8 \gamma$  Lab-N/cm<sup>3</sup> erhöht. Die Kurve (Nr. 6, gestrichelt) steigt erneut an und nach kurzer Zeit wird das Plateau der höchsten Labkonzentration erreicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Die von *Alais* et al. (l. c.) gemachte Feststellung, dass die NPN-Endwerte von der Menge des zugesetzten Labes unabhängig sind, gilt nur für Labkonzentrationen oberhalb eines bestimmten kritischen Wertes. Darunter macht sich eine Hemmung des Fermentes geltend, die einen kleineren Endwert für die Primärreaktion vortäuscht<sup>1)</sup>.

c) Einfluss des pH. Am übersichtlichsten und am leichtesten deutbar sind vorläufig diejenigen Versuchsreihen, bei denen Substrat- und Enzymkonzentration konstant gehalten und nur die Reaktionsbedingungen wie pH oder Temperatur variiert wurden.

Der pH-Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde für pH zwischen 5,5 und 6,7 und zwischen 2,0 und 3,5 untersucht. Zwischen diesen beiden pH-Gebieten ist das Casein unlöslich; bei pH über 7 kann man auch nicht arbeiten, weil da das Lab rasch inaktiviert wird.

In Fig. 3 sind die Abbau-Kurven für fünf pH im oberen Bereich (5,5; 5,8; 6,1; 6,4; 6,7) bei 25° wiedergegeben.

Bedingungen: Casein in der Mischung: 2,0%; Labkonz. in der Mischung:  $0,2 \gamma$  N/cm<sup>3</sup>; NPN-Nullwert: 0,4%.

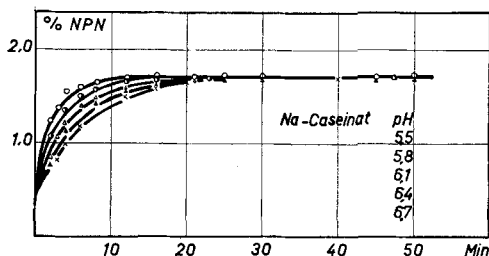


Fig. 3.

Einfluss des pH zwischen 5,5 und 6,7.

Alle Kurven enden genau beim gleichen NPN-Endwert und folgen, wie aus Fig. 4 hervorgeht, recht gut dem Gesetz für Reaktionen 1. Ordnung. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten als Funktion des pH sind ebenfalls in Fig. 4 wiedergegeben.

In Fig. 5 finden sich die Abbau-Kurven für die sauren Caseinhydrochloridlösungen bei pH 2,0; 2,7 und 3,5, bei 25°.

Bedingungen: Casein in der Mischung: 2,0%; Labkonz. in der Mischung:  $0,5 \gamma$  N/cm<sup>3</sup>; NPN-Nullwert: 0,4%.

Die Labkonzentration ist also 2,5 mal grösser als bei den Versuchen der Fig. 3 und 4. Zum Vergleich ist deshalb eine Abbaukurve (punktiert) eingezeichnet, die mit der gleichen Labkonzentration bei pH 6,7 erhalten wurde.

<sup>1)</sup> Ganz ähnliche Ergebnisse wurden übrigens mit *Keller* bei Lösungen von reinem  $\alpha$ -Casein erhalten. Diss. W. Keller, Bern 1954.

Aus Fig. 4 ergibt sich klar, dass die Geschwindigkeit der Primärreaktion beim Senken des pH von 6,7 nach 5,5 beinahe verdreifacht wird. Von der Labgerinnung der Milch weiss man, dass sie als Ganzes durch pH-Senkung ebenfalls beschleunigt wird. Mit der neuen Technik ist es nun aber möglich geworden, den pH-Einfluss auf die Enzymreaktion vollständig losgelöst von den kolloidchemischen Vorgängen der Gerinnung zu ermitteln.

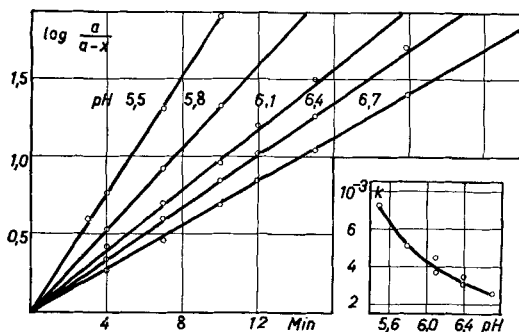


Fig. 4.

pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

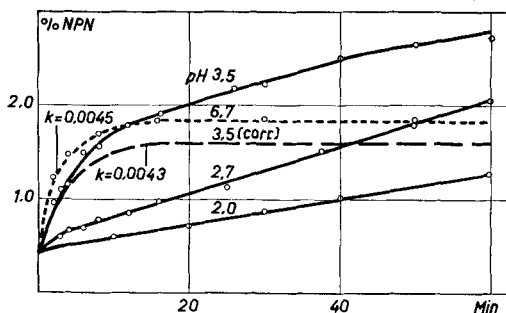


Fig. 5.

Einfluss des pH zwischen 2 und 3,5.

Bei den Abbaukurven der sauren Lösungen fällt zuerst auf, dass das lineare Kurvenstück nicht parallel zur Abszisse verläuft wie bei pH 6,7 sondern ziemlich steil ansteigt. Die unspezifische Proteolyse ist hier also kräftig am Werke. Nur die Kurve für pH 3,5 zeigt einen anfänglichen Sprung, der fast gleich hoch ist wie der bei pH 6,7.

Für den Versuch bei pH 3,5 haben wir in gleicher Weise, wie in Abschnitt 1 beschrieben, eine korrigierte Kurve (gestrichelt) konstruiert, welche die Primärreaktion allein zum Ausdruck bringt. Ihre graphische Auswertung ergab eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, die innerhalb der Fehlergrenze gleich der für den entsprechenden Versuch bei pH 6,7 war. Das pH-Optimum der Primärreaktion muss also zwischen 3,5 und 5,5 liegen.



Beim Übergang zu tieferen pH verändern sich die Abbaukurven in merkwürdiger Weise. Der Sprung, der die Primärreaktion ausdrückt, verschwindet immer mehr und fehlt bei pH 2 bereits ganz. Die unspezifische Proteolyse bleibt aber trotzdem noch sehr aktiv, wenn sie auch von pH 2,7 gegen 2 etwas verlangsamt wird. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Versuchen von *Berridge*<sup>1)</sup> und von *de Baun, Connors & Sullivan*<sup>2)</sup> über die proteolytische Aktivität des Labes gegenüber Hämoglobin. Sie fanden für die Aktivitätskurve bei pH ca. 3,7 ein Maximum, das nach tieferen pH flach, nach höheren pH aber sehr steil abfiel, so dass oberhalb pH 5 praktisch überhaupt keine Aktivität mehr gefunden wurde. Letzteres findet in den horizontalen Plateaus der Abbaukurven unserer Na-Caseinatlösungen seine Bestätigung.

Die pH-Versuchsreihe zeigt besonders deutlich, dass Primärreaktion und unspezifische Proteolyse zwei voneinander unabhängige Reaktionen sind, die verschiedenen Gesetzen folgen. Die Primärreaktion ist nicht einfach der Anfang der allgemeinen Proteolyse, denn bei pH 2 haben wir Proteolyse ohne Primärreaktion. Ähnliche Beobachtungen haben *Mattenheimer & Nitschmann*<sup>3)</sup> gemacht, indem sie fanden, dass gewisse proteolytische Fermente wie Trypsin, Pilzprotease und Papain unter bestimmten Bedingungen mit Casein geradlinige Abbaukurven ergeben, d. h. Proteolyse ohne Primärreaktion bewirken. Die beiden Autoren konnten auch zeigen, dass in diesen Fällen das Casein tatsächlich auch nicht in Lab- oder Paracasein übergeführt wird.

Wir haben dieselbe Feststellung für den Abbau-Versuch bei pH 2 gemacht. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

Die beiden Versuche bei pH 2,0 und bei 3,5 wurden mit unveränderten Bedingungen wiederholt. Nach 120 Min. war im pH-2-Ansatz 1,7% NPN abgespalten, was etwa dem Endwert einer normal verlaufenden Primärreaktion entsprechen würde. Die Reaktion wurde deshalb nach dieser Zeit abgebrochen, indem der Ansatz in 2 Volumen 80° warme Pufferlösung (Acetat/Veronal, pH 7,8; Ionenstärke 0,2) eingegossen wurde. Der vorübergehend entstandene Caseinniederschlag löste sich rasch auf. Die Lösung, die nun ein pH von 6,6 zeigte, wurde 10 Min. bei 80° belassen, um das Lab zu inaktivieren. Nach dem Abkühlen wurden zu 3 cm<sup>3</sup> dieser Lösung 2 cm<sup>3</sup> 1-m. CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben. — Der Abbauversuch bei pH 3,5 wurde nach 15 Min. (1,9% NPN) in analoger Weise abgebrochen und weiterbehandelt (pH des Puffers 7,5, End-pH ebenfalls 6,6). Zu beiden Abbauversuchen wurden Kontrollversuche durchgeführt, bei denen einzig das Lab weggelassen wurde.

Die beiden Kontrollen hatten, wie zu erwarten, das Aussehen von Magermilch. Die bei pH 2 gelabte Lösung sah ebenfalls wie homogene Magermilch aus, während in der bei pH 3,5 gelabten Lösung das Calciumcaseinat ausgeflockt war und bald sedimentierte. Da die Koagulierbarkeit durch Calcium das typischste Merkmal des Paracaseins ist, beweist dieser Versuch, dass bei Labung bei pH 2 die Primärreaktion trotz Proteolyse tatsächlich ausbleibt.

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

<sup>2)</sup> *R. M. de Baun, W. M. Connors & R. A. Sullivan*, *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 324 (1953).

<sup>3)</sup> *H. Mattenheimer & Hs. Nitschmann*, *Helv.* **38**, 687 (1955).

d) Einfluss der Temperatur. Die Reaktion wurde bei 1°, 10°, 20° und 30° untersucht (Fig. 6).

Das pH betrug wieder 6,7; übrige Bedingungen wie bei der pH-Versuchsreihe oberhalb 5,5. NPN-Nullwert: 0,35%.

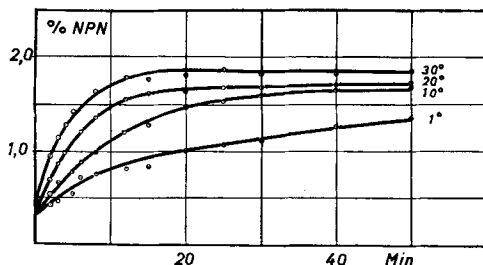


Fig. 6.

Einfluss der Temperatur zwischen 1° und 30°.

Trägt man für die vier Kurven  $\log [a/(a - x)]$  gegen die Zeit auf und verwendet dabei überall als  $a$  den bei 30° gefundenen maximalen NPN-Wert, so ergeben sich bis hinauf zu etwa 12 Min. Geraden, die durch den Nullpunkt gehen; nachher fallen die Werte allmählich ab, besonders für die tieferen Temperaturen. Den aus den Geraden ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten darf deshalb keine grosse Genauigkeit beigegeben werden, doch bieten sie trotzdem noch genügend Interesse.

In Tab. 2 sind die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die vier Temperaturen eingetragen, dazu die daraus mit Hilfe der bekannten Formeln berechneten Grössen:  $Q_{10}$  = Temperatur-Koeffizient pro 10°,  $E$  = Aktivierungsenergie in cal/Mol und  $\Delta S$  = Aktivierungsentropie in cal/Mol · Grad.

Tabelle 2.

Temp.	k	$Q_{10}$	E	$\Delta S$
30°	0,0048			
20°	0,0023	1,78	10000	-38
10°	0,00126	1,83	9850	-39
1°	0,00063	2,00	10500	-37

$Q_{10}$  darf über das ganze Temperaturgebiet als ungefähr gleich angesehen werden und beträgt 1,8–2. Diese Temperaturabhängigkeit ist grösser als die, welche *de Baun, Connors & Sullivan* (l. c.) für die proteolytische Aktivität des Labes bei pH 3,9 gefunden haben ( $Q_{10} = 1,2$ ). Sie ist aber noch lange nicht so gross, wie die der Labgerinnungszeiten der Milch<sup>1)</sup>. Das ist nicht verwunderlich, da in die Gerinnungszeit auch die Sekundärreaktion, d. h. der eigentliche

<sup>1)</sup>  $Q$  ist hier sehr temperaturabhängig, und zwar mit fallender Temperatur steigend. Zwischen 20° und 30° beträgt  $Q_{10}$  wenigstens 5–6. Siehe *E. R. Ling, A Textbook of Dairy Chemistry*, Bd. 1, S. 149 (1949).

Koagulationsvorgang eingeht, der ja besonders stark temperaturabhängig ist. Die Sekundärreaktion verändert in der Kälte sogar ihren Charakter weitgehend. Unter 15° kann mit dem blossen Auge gar keine Gerinnung mehr festgestellt werden. Aggregation der Ca-Caseinat-Teilchen findet aber trotzdem statt, nur bleiben die Flöckchen so klein, dass man sie höchstens mit einer Lupe sehen kann. Durch Streulicht-<sup>1)</sup> oder Absorptionsmessungen<sup>2)</sup> ist die Aggregation sehr leicht zu verfolgen. Bei Erhöhung der Ca-Ionen-Konzentration über den normalen Wert der Milch hinaus erhält man aber auch bei tieferen Temperaturen eine von blossen Auge sichtbare Gerinnung<sup>1)</sup>.

Es ist gelegentlich vermutet worden, dass die starke Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeit der Labgerinnung der Milch dadurch bedingt ist, dass ein Denaturierungsvorgang entscheidend beteiligt ist. Unsere Versuche haben gezeigt, dass mindestens bei der Primärreaktion eine Denaturierung nicht geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Q und E müssten dann viel grösser und  $\Delta S$  sollte positiv sein. Unsere Werte sind aber gut vereinbar mit der Annahme, dass die enzymatische Reaktion eine Proteolyse ist.

#### SUMMARY.

The velocity of the splitting reaction, which casein undergoes under the action of rennin and which is responsible for the rennet curdling of milk, can be determined by measuring at suitable time intervals the nitrogen soluble in trichloroacetic acid (non protein nitrogen: NPN). The NPN/time curves thus obtained generally follow fairly well the equation for first order reactions. The velocity constants have been determined graphically.

This method is less accurate than the ones with which hydrolysis velocities are determined by titrating the newly liberated groups, because it is based on the differences in solubility of the degradation products. It is, however, up to now the only method by which this primary reaction has successfully been measured detached from the colloid chemical processes of the curdling, and it seems useful at least for comparative studies.

Some results concerning the influence of the enzym concentration, the pH and the temperature are reported. The optimum of the primary reaction lies between pH 3,5 and 5,5. At pH 2 the primary reaction is suppressed completely though the unspecific proteolysis is much stronger than in the range above pH 5,5. The temperature coefficient  $Q_{10}$  of the velocity of the primary reaction at pH 6,7 between 1° and 30° C. is 1,8–2,0. This value is consistent with the assumption of a proteolysis but not of a denaturation.

Bern, Institut für organische Chemie der Universität.

<sup>1)</sup> O. Claesson & Hs. Nilschmann, in Vorbereitung.

<sup>2)</sup> W. Neudert, Milchwirtschaftl. Forsch. **18**, 87 (1936).