

**43. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch.  
XI<sup>1</sup>). Die aminoseitigen Endgruppen des  $\alpha$ -Caseins  
vor und nach der Labung**

von Hans Wissmann und Hs. Nitschmann.

(22. I. 57.)

Vor einigen Jahren haben *Mellan, Korn & Hoover*<sup>2</sup>) die aminoseitigen Endgruppen im  $\alpha$ - und im  $\beta$ -Casein der Kuhmilch bestimmt. Bei beiden Caseinen fanden sie Arginin und Lysin, doch in verschiedenen Verhältnissen und Mengen. Aus Labcasein gewonnene Fraktionen wurden unseres Wissens nie auf ihre Endgruppen hin untersucht.

Bisher wurde das aus Säurecasein isolierbare  $\alpha$ -Casein als das Substrat für die Primärreaktion (enzymatische Phase) der Labgerinnung der Milch angesehen<sup>3</sup>), in deren Verlauf von diesem Protein bzw. Proteinkomplex ein kleiner Teil in Form von in Trichloressigsäure löslichen Peptiden abgetrennt wird<sup>4</sup>)<sup>5</sup>). Diese Spaltungsreaktion verläuft ausserordentlich rasch und ist bereits zu Ende, wenn die ihr überlagerte unspezifische Proteolyse durch Titration der freien Amino- und Carboxylgruppen noch kaum nachweisbar ist. Die Primärreaktion der Labgerinnung der Milch gehört somit vermutlich wie die durch Thrombin ausgelöste Konversion von Fibrinogen in Fibrin und die Aktivierung mancher Profermente zu den spezifischen, limitierten Proteolysen<sup>6</sup>). Wenn auch über die proteolytische Wirksamkeit der reinsten bisher hergestellten Labpräparate kein Zweifel besteht<sup>7</sup>)<sup>8</sup>)<sup>9</sup>), so ist bisher doch kein zwingender Beweis dafür erbracht worden, dass die die Milcherinnung auslösende Reaktion ebenfalls eine proteolytische ist. Da ein proteolytisch angegriffenes Protein gegenüber dem nativen Protein meist Änderungen im Bestand der amino- oder carboxylseitigen Endgruppen aufweist, schien es von Interesse,  $\alpha$ -Casein und  $\alpha$ -Labcasein

<sup>1)</sup> Nr. X dieser Reihe: *Hs. Nitschmann & H. U. Bohren*, Helv. **38**, 1953 (1955).

<sup>2)</sup> *E. F. Mellon, A. H. Korn & S. R. Hoover*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 1675 (1953).

<sup>3)</sup> *E. Cherbuliez & P. Baudet*, Helv. **33**, 398, 1673 (1950). — *Hs. Nitschmann & W. Keller*, Helv. **38**, 942 (1955).

<sup>4)</sup> *Ch. Alais, G. Mocquot, Hs. Nitschmann & P. Zahler*, Helv. **36**, 1955 (1953).

<sup>5)</sup> *Hs. Nitschmann & W. Keller*, Helv. **38**, 942 (1955). — *T. Tsugo & K. Yamauchi*, XIV. Internat. Milchwirtschaftskongress Rom, 1956; Vol. II, p. 588.

<sup>6)</sup> Siehe hierzu *P. Desnuelles & M. Rovery*: Sur quelques protéolyses limitées d'intérêt biologique. Conf. et Rapp., 3ème Congrès Internat. de Biochimie, Bruxelles 1955 (p. 78).

<sup>7)</sup> *N. J. Berridge*, Biochem. J. **39**, 179 (1945).

<sup>8)</sup> *Hs. Nitschmann & R. Varin*, Helv. **34**, 1421 (1951).

<sup>9)</sup> *R. M. de Baun, W. M. Connors & R. A. Sullivan*, Arch. Biochemistry Biophysics **43**, 324 (1953); *Oeda Masayoshi*, XIV. Milchwirtschaftskongress, Rom 1956, Vol. II, p. 379.

in dieser Hinsicht miteinander zu vergleichen. Im folgenden berichten wir zunächst über die Ergebnisse, die wir mit der *Sanger'schen* Methode der Amino-Endgruppenbestimmung mit Hilfe von Dinitrofluorbenzol erhalten haben.

### Experimentelles.

**Caseine.** Das  $\alpha$ -Casein wurde nach der Harnstoff-Methode von *Hipp et al.*<sup>10)</sup> aus frischem Säurecasein gewonnen. Die Isolierung des Ausgangscaseins aus Kuhmilch ist früher beschrieben worden<sup>4).</sup> Das  $\alpha$ -Casein war bei pH 7,3 elektrophoretisch einheitlich.

Die Überführung des  $\alpha$ -Caseins in  $\alpha$ -Labcasein geschah wie folgt: Das  $\alpha$ -Casein wurde in  $H_2O$  suspendiert und durch allmählichen Zusatz von verdünnter NaOH in eine 3-proz. Lösung vom pH 6,8 übergeführt. Die Fermentierung geschah bei 25° mit kristallisiertem Lab<sup>11)</sup>. Die Labmenge war so gewählt, dass der mit 12% Trichloressigsäure nicht fällbare Stickstoff (NPN = Nicht-Protein-N) nach 30 Min. praktisch seinen Endwert erreicht hatte. Die zeitliche Zunahme der NPN-Werte lässt, wie früher gezeigt wurde<sup>1)</sup>, den Verlauf der Primärreaktion erkennen. Nachdem diese beendet war, wurde das  $\alpha$ -Labcasein durch Zugabe von 0,1-n. HCl bis zum pH 4,6 ausgefällt. Der Niederschlag wurde sofort abfiltriert, in wenig Wasser aufgeschwemmt und sofort unter rascher Temperatursteigerung 5 Min. auf 80° erhitzt (zur Inaktivierung von noch vorhandenem Lab). Nun wurde gründlich gewaschen, das Wasser aus dem Casein mit Alkohol und dann mit Äther verdrängt und das Präparat schliesslich im Vakuumexsikkator über  $H_2SO_4$  getrocknet. Aufbewahrung über  $P_2O_5$ .

**Die Dinitrophenylierung der Caseine.** 300 mg Protein wurden in 30 ml 0,1-n. NaOH gelöst (pH ca. 12); anschliessend wurde das pH der Lösung durch Einleiten von  $CO_2$  sofort auf 8,4 gesenkt. Nun wurde mit 10 ml Dioxan versetzt, auf 40° erwärmt und unter Rühren allmählich mit 3 ml einer 10-proz. Lösung von Dinitrofluorbenzol in Dioxan versetzt. Nach insgesamt 2½ Std. Reaktionszeit wurde abgekühlt und dreimal mit Essigester extrahiert, um das überschüssige Dinitrofluorbenzol zu entfernen. Nun wurde das Dinitrophenyl-(DNP)-Protein durch Ansäuern (pH ca. 2) ausgefällt, abzentrifugiert und mit Wasser salzfrei gewaschen. Nach einmaligem Suspendieren in Äthanol/ $H_2O$  1:1 und Zentrifugieren wurde dann so oft mit Äthanol durch Suspendieren und Zentrifugieren extrahiert, bis die bei 355  $m\mu$  gemessene Extinktion des Waschalkohols konstant wurde. Der Wert sinkt nicht auf Null ab; das DNP-Casein hat offenbar eine geringe, aber doch messbare Löslichkeit im Alkohol. Der Extinktionsendwert entspricht ca. 0,1  $\gamma$  Dinitrophenol pro ml. Das Auswaschen dauert sehr lange, da insbesondere das bei der Reaktion entstandene Dinitrophenol vom Eiweiss sehr fest adsorbiert wird.

Das DNP- $\alpha$ -Labcasein wurde noch ein zweites Mal dinitrophenyliert.

**Hydrolyse der DNP-Proteine und Aufarbeitung der Hydrolysate.** Diese Operationen wurden im wesentlichen gleich durchgeführt wie bei *Mellon et al.*<sup>2)</sup>. Folgende Änderungen kamen zur Anwendung: Nachdem das Hydrolysengemisch mit Äther extrahiert worden war, wurde die wässrige Phase nach der Methode von *Sanger*<sup>12)</sup> auf eine Talksäule gegeben und die freien Aminosäuren mit 1-n. HCl durchgewaschen. Die DNP-Aminosäuren bleiben adsorbiert und werden nachher mit Äthanol/1-n. HCl (4:1) eluiert. Eindampfen des Eluates im Vakuum bei Zimmertemperatur.

Allgemeines zur Papierchromatographie. Es wurde absteigend mit *Whatman*-Papier Nr. 1 bei 20° gearbeitet. Als Lösungsmittel kamen abwechselnd die drei von *Mellon et al.*<sup>2)</sup> angegebenen Mischungen A, B und C (aufsteigend) sowie *Partridge*-Lösung (Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1, absteigend) zur Anwendung. Bei der Auftrennung von Di-DNP-

<sup>10)</sup> *H. J. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer & T. L. McMeekin, J. Dairy Science* **35**, 272 (1952).

<sup>11)</sup> Dasselbe uns von *N. J. Berridge*, Reading, England, geschenkte Präparat, das schon in früheren Arbeiten<sup>4)</sup><sup>5)</sup> verwendet wurde.

<sup>12)</sup> *F. Sanger, Biochem. J.* **45**, 563 (1949).

Lysin und DNP-Phenylalanin (ätherlösliche Fraktion aus dem Hydrolysat von DNP- $\alpha$ -Labcasein) wurde auch 2-dimensionale Chromatographie angewendet. Erste Dimension: Butanol/0,1-proz. NH<sub>3</sub>. Zweite Dimension: 1,5-m. Phosphatpuffer (1-m. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5-m. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Diese Technik trennt zwar die beiden DNP-Aminosäuren sehr gut, jedoch lässt sich eine kleine Menge Dinitrophenol, die auch mit der nach Isherwood & Cruickshank<sup>13)</sup> durchgeführten Trennung nicht entfernt werden konnte, schlecht von dem vorhandenen grossen Überschuss an DNP-Phenylalanin trennen. Dieses Dinitrophenol (5,6% der Summe der chromatographierten DNP-Aminosäuren) konnte bei der photometrischen Auswertung jedoch leicht in Abzug gebracht werden, da seine Menge zuvor in einem eindimensionalen Papierchromatogramm mit Mellon's Lösungsmittel B ermittelt worden war.

Zur Identifizierung der Flecke liess man wie üblich Testsubstanzen mitlaufen. Für die Spektrophotometrierung wurden die Flecke ausgeschnitten und mit 1-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung eluiert.

Allgemeines zur Säulenchromatographie. Auch hier wurde in Anlehnung an Mellon et al. gearbeitet, jedoch verzichteten wir auf die von Bailey<sup>14)</sup> empfohlene Vorbehandlung der Silicagelsäule mit Formaldehyd, weil nach unsrern Erfahrungen papierchromatographisch einheitliches  $\epsilon$ -DNP-Lysin bei dieser Arbeitsweise leicht in 2 Bändern zerlegt wird, von denen die langsamere freies  $\epsilon$ -DNP-Lysin, die schnellere, vor dem DNP-Arginin laufende, die Formolverbindung enthält. Die schnellere Bande trennt sich zudem schlecht von schnellwandernden Hydrolyse-Zersetzungspunkten ab, von denen man trotz der vorhergegangenen Ätherextraktion meist immer noch etwas in der Wasserfraktion hat. Während das  $\epsilon$ -DNP-Lysin im Chromatogramm des mit einem zeitgesteuerten Fraktionenkollektors aufgefangenen Säuleneluates eine annähernd symmetrische Spitze ergab, zog die Spitze des DNP-Arginins eine breite Schulter oder sogar ein zweites flacheres Maximum nach sich. Reines DNP-Arginin zeigte im Testversuch an der Silicagelsäule eine nahezu symmetrische Bande. Die Verunreinigung, welche in unserer Analyse die Asymmetrie der DNP-Argininbande verursachte, konnte dadurch beseitigt werden, dass die an der Talkäsäule aus dem Totalhydrolysat isolierten DNP-Verbindungen nochmals mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt und mit Äther extrahiert wurden. Dass diese Reinigung wirksam ist, beweist, zusammen mit den vor diesem Arbeitsgang festgestellten Eigenschaften der Verunreinigung (Nichtextrahierbarkeit aus saurer wässriger Lösung durch Äther und Wanderung mit DNP-Arginin auf der Silicagelsäule), dass es sich bei ihr nicht um eine DNP-Endaminosäure handeln kann. Auf den Versuch zur Identifizierung dieser Komponente wurde deshalb verzichtet.

Quantitative Auswertung der Chromatographie-Versuche. Alle DNP-Verbindungen wurden spektrophotometrisch bei 355 m $\mu$  bestimmt (Beckman Spektrophotometer Modell B).

Da die Hydrolyse der DNP-Proteine sowie die nachfolgenden Trennungsoperationen mit beträchtlichen und für die einzelnen DNP-Aminosäuren wechselnden Verlusten verbunden sind, müssen die gefundenen Werte entsprechend korrigiert werden. Soweit vorhanden, haben wir die Korrekturfaktoren von Mellon et al. übernommen. Dort wo wir anders als diese Autoren gearbeitet haben, haben wir die Ausbeuten mit Hilfe von reinen Test-Substanzen selber bestimmt in Versuchen, deren Arbeitsbedingungen und Mengenverhältnisse soweit wie möglich denen der Analyse angeglichen waren. Für die DNP-Argininbestimmung mit der vorstehend erwähnten zweiten Dinitrophenylierung der wasserlöslichen Fraktion wurden beispielsweise 207 mg  $\alpha$ -Casein zusammen mit 2,0 mg DNP-Arginin und 23 mg  $\epsilon$ -DNP-Lysin der Säurehydrolyse und allen nachfolgenden Operationen unterworfen und schliesslich wurde die Ausbeute für das DNP-Arginin zu 30% bestimmt.

<sup>13)</sup> Isherwood & Cruickshank. Siehe H. M. Schwartz & C. H. Lea, Biochem. J. **50**, 713 (1952).

<sup>14)</sup> K. Bailey, Biochem. J. **49**, 23 (1951).

Bestimmung des DNP-Arginins mit Hilfe der Farbreaktion von *Sakaguchi*. Wegen der erwähnten Schwierigkeit bei den säulenchromatographischen Bestimmung des DNP-Arginins versuchten wir noch, dasselbe nach Abtrennung der freien Aminosäuren aus dem DNP-Protein-Hydrolysat direkt mit der Reaktion von *Sakaguchi* zu bestimmen. Dies ist in der Tat möglich, wenn man die Extinktion bei 525 m $\mu$  misst, wo der DNP-Rest nur sehr schwach absorbiert. Der Anteil des letzteren an der Extinktion kann als Korrektur abgezogen werden.  $\epsilon$ -DNP-Lysin stört die Reaktion nicht. Wir arbeiteten wie folgt:

Etwa 50 mg DNP-Protein wurden mit 5 ml 6-n. HCl bei 110° 19 Std. im Einschlusserohr hydrolysiert. Aus dem Hydrolysengemisch wurden die freien Aminosäuren auf der Talksäule<sup>15)</sup> abgetrennt (Waschen mit 50 ml 1-n. HCl). Danach wurden die DNP-Aminosäuren mit Alkohol/1-n. HCl (4:1) eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft und der Rückstand in 10 ml Wasser aufgenommen. Für die Bestimmung des DNP-Arginins in dieser Lösung mit der *Sakaguchi*-Farbreaktion wurde im weiteren nach der Arbeitsvorschrift von *Mcpherson*<sup>16)</sup> vorgegangen. Beim DNP- $\alpha$ -Casein musste das von *Mcpherson* angegebene End-Lösungsvolumen von 25 auf 50 ml heraufgesetzt werden, um das Ausfallen eines roten Niederschlages zu vermeiden. Die Extinktion bei 525 m $\mu$  wurde mit Hilfe einer Eichkurve ausgewertet.

Beispiel: Einwage: 51,4 mg DNP- $\alpha$ -Labcasein; Volumen: 25 ml; Extinktion bei 525 m $\mu$  und 10 mm Schichtdicke: 0,655.

DNP-Arginin, entsprechend der Extinktion bei 525 m $\mu$	200	$\gamma$
Korrigiert für die DNP-Absorption bei 325 m $\mu$ (0,023 = 3,5% der Extinktion)	194	$\gamma$
+ Korrektur für Adsorptionsverlust an der Talksäule (8% entspr. 15,5 $\gamma$ )	209,5	$\gamma$
Nach Korrektur für Hydrolysenausbeute (85%) des DNP-Arginins	245	$\gamma$
DNP-Arginin bezogen auf die Einwage	0,50%	

Resultate s. Tab. 1; alle Werte sind auf eine Dezimale hinter dem Komma aufgerundet.

### Diskussion.

Der totale DNP-Gehalt ist beim DNP- $\alpha$ -Labcasein etwa 20 % grösser als beim DNP- $\alpha$ -Casein. Das ist nicht verwunderlich, denn ersteres ist zweimal dinitrophenyliert worden, letzteres nur einmal. Es ist bekannt, dass, während freie  $\alpha$ -Aminogruppen im allgemeinen leicht umgesetzt werden, ein quantitativer Umsatz der  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins oft Schwierigkeiten bereitet<sup>2)</sup>. Tatsächlich wurde beim  $\alpha$ -Labcasein bedeutend mehr  $\epsilon$ -DNP-Lysin als beim  $\alpha$ -Casein gefunden. Beim Labcasein stimmt die Zahl (60,4) ungefähr mit dem höchsten theoretisch möglichen Wert überein, wenn die von *Gordon, Semmett, Cable & Morris*<sup>17)</sup> gefundenen 61 Mole Lysin pro 10<sup>5</sup> g  $\alpha$ -Casein als richtig angenommen werden. *Mellan, Korn & Hoover* konnten nur 23,8 Mole Ketten-Lysin pro 10<sup>5</sup> g  $\alpha$ -Casein als  $\epsilon$ -DNP-Lysin erfassen, und zwar trotzdem ihr Gesamt-DNP-Gehalt grösser als bei uns war. Es wäre möglich, dass dieser scheinbare Widerspruch darauf beruht, dass diese Autoren das DNP-Casein nicht genügend lang extrahiert haben; nach unsrern Erfahrungen jedenfalls wird freies Dinitrophenol sehr hartnäckig vom DNP-Casein festgehalten.

<sup>15)</sup> Die 16 mm weite Säule hatte eine Füllung von 20 g Talkum.

<sup>16)</sup> *H. T. Mcpherson*, Biochem. J. **36**, 59 (1942).

<sup>17)</sup> *W. G. Gordon, W. F. Semmett, R. S. Cable & W. Morris*, J. Amer. chem. Soc. **71**, 3293 (1949).

**Tabelle 1.**  
Analysenergebnisse.

	$\alpha$ -Casein	$\alpha$ -Labcasein
Totaler DNP-Gehalt <sup>a)</sup> als C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -Rest in % des DNP-Proteins in Molen pro 10 <sup>5</sup> g DNP-Protein	7,5 45,3	9,6 56
Proteingehalt des DNP-Proteins in %	92,5	90,4
Ketten-Lysin (als $\epsilon$ -DNP-Lysin bestimmt) in Molen pro 10 <sup>5</sup> g Protein	40 42 <sup>b)</sup>	60,4 <sup>c)</sup>
Amino-endständiges Lysin in Molen pro 10 <sup>5</sup> g Protein	1,2 1,7 1,4	0,7 0,8 <sup>e)</sup> 1,0
Amino-endständiges Arginin in Molen pro 10 <sup>5</sup> g Protein	1,1 2,2 1,2 2,1 <sup>g)</sup>	1,6 <sup>g)</sup> 2,0 <sup>c)</sup> 1,8
Amino-endständiges Phenylalanin in Molen pro 10 <sup>5</sup> g Protein	keines	1,7 1,8 <sup>e)</sup>
Summe der $\alpha$ -Amino-Endgruppen in Molen pro 10 <sup>5</sup> g Protein	3,2	4,4
Proteingewicht in g pro 1 Mol Endgruppe	31000	23000

a) Am unhydrolysierten DNP-Protein spektrophotometrisch bestimmt.

b) Silicagel-Säulenchromatographie.

c) Papierchromatographie mit Partridge-Lösungsmittel (4:1:1).

d) Identifizierung durch Papierchromatographie mit Mellon's Lösungsmittel B; quantitative Bestimmung nach Mellon *et al.*

e) 2-dimensionale Papierchromatographie.

f) Silicagel-Säulenchromatographie; DNP-Arginin als symmetrische Spitze, nach nochmaliger Dinitrophenylierung der DNP-Aminosäuren. Ohne diese Nachbehandlung erscheint DNP-Arginin als Doppelspitze, die im Mittel einen Wert von 4,2 (4,5; 3,6; 4,6) ergibt.

g) Direkte Bestimmung in der Mischung der DNP-Aminosäuren mit der Farbreaktion von Sakaguchi.

Als aminoseitige Endgruppen wurden beim  $\alpha$ -Casein in Übereinstimmung mit Mellon, Korn & Hoover nur Lysin und Arginin gefunden. Daraus darf wohl geschlossen werden, dass unser  $\alpha$ -Casein ebenso schonend hergestellt worden ist, wie das, welches diese drei Autoren untersuchten. Beim Arbeiten mit technischem Säurecasein kann eine grössere Zahl von Endaminosäuren gefunden werden, wie aus den Untersuchungen von Lea *et al.*<sup>18)</sup> hervorgeht.

<sup>18)</sup> C. H. Lea & R. S. Hannan, Biochem. biophys. Acta **4**, 518 (1950). — H. M. Schwartz & C. H. Lea, Biochem. J. **50**, 713 (1952).

Unser Mittelwert von 1,4 Mol pro  $10^5$  g  $\alpha$ -Casein für das endständige Lysin stimmt mit dem von *Mellan et al.* angegebenen gut überein.

Für das endständige Arginin geben *Mellan et al.* 10,7 Mole pro  $10^5$  g  $\alpha$ -Casein an. Die von uns gefundenen Werte liegen viel tiefer. Bei der Chromatographie auf der Silicagelsäule fanden wir einen Mittelwert von 4,2, also nicht einmal halb soviel wie *Mellan et al.* Dabei war das Elutionsmaximum, wie im experimentellen Teil ausgeführt wurde, nicht einheitlich, sondern zeigte sehr deutlich eine beträchtliche Verunreinigung des DNP-Arginins an. Nach nochmaliger Dinitrophenylierung der wasserlöslichen DNP-Aminosäuren erschien im Eluat der Silicagelsäule ein einheitliches DNP-Arginin. Seine Menge – nur mit grossen Streuungen bestimmbar – betrug jetzt höchstens noch ca. 2 Mole pro  $10^5$  g  $\alpha$ -Casein. Eine gleiche Menge wurde auch bei direkter Bestimmung des DNP-Arginins in der Mischung der DNP-Aminosäuren mit Hilfe der spezifischen Farbreaktion von *Sakaguchi* gefunden. Diese Arbeitsweise wurde von uns erstmals angewandt. Sie hat gegenüber dem vorerwähnten Verfahren der nochmaligen Dinitrophenylierung der aus dem Hydrolysat isolierten DNP-Aminosäuren wesentliche Vorteile; sie ist einfacher, erfordert weniger Korrekturen und reduziert die Gefahr einer Zersetzung des DNP-Arginins, die besonders bei langen Aufarbeitungen besteht, auf ein Minimum. Die Zulässigkeit der Methode ist durch Testversuche gezeigt worden. Die relativ gute Übereinstimmung der mit dieser Methode gefundenen Werte mit denjenigen der Säulenchromatographie am nach-dinitrophenylierten DNP-Arginin lassen an dem Mittelwert von ca. 1,8 Molen für das endständige Arginin wohl keinen grossen Zweifel übrig. Ob das  $\alpha$ -Caseinpräparat von *Mellan et al.* tatsächlich ein Mehrfaches an freien Arginin-Endgruppen enthieilt oder ob diese Autoren ein verunreinigtes DNP-Arginin aus ihrer Silicagelsäule eluiert und kolorimetriert haben, bleibt vorerst eine offene Frage.

In unserem  $\alpha$ -Casein kommen auf 100000 g ca. 3,2 Mole freie  $\alpha$ -Aminogruppen bzw. 1 Mol auf ca. 31000 g (bei *Mellan et al.* 1 Mol Endgruppe auf 8200 g  $\alpha$ -Casein).

Das wirkliche Molekulargewicht eines Proteins kann aus Endgruppenbestimmungen bekanntlich nicht erschlossen werden. Kürzlich wurde durch *von Hippel & Waugh*<sup>19)</sup> mit der Ultrazentrifuge gezeigt, dass monomeres  $\alpha$ -Casein, wie es in Alkalicaseinatlösungen vom pH 11–12 vorliegt, ein Teilchengewicht von 13000 bis 15000 aufweist. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden zeigt eindeutig, dass das  $\alpha$ -Casein, welches mit der Methode von *Hipp et al.*<sup>10)</sup> aus Säurecasein herausfraktioniert wird, nicht einheitlich sein kann und mindestens hinsichtlich des Amino-Endgruppenbestandes verschiedenartige Teilchen enthalten muss. Dies steht in

<sup>19)</sup> P. H. von Hippel & D. F. Waugh, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4311 (1955).

Übereinstimmung mit der von *Warner*<sup>20)</sup> unter gewissen Bedingungen beobachteten Aufspaltung des aufsteigenden Gradienten des  $\alpha$ -Caseins in der *Tiselius*-Elektrophorese, ferner auch mit der Tatsache, dass *Cherbuliez & Baudet*<sup>21)</sup> aus Säurecasein gewonnenes  $\alpha$ -Casein in zwei Fraktionen mit verschiedener elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit zerlegen konnten. Ganz kürzlich haben *Waugh & von Hippel*<sup>22)</sup> über eine von ihnen *k*-Casein genannte Fraktion berichtet, die bei den bisher üblichen Fraktioniermethoden für Säurecasein mit der  $\alpha$ -Fraktion geht und ca. 27% derselben ausmachen soll.

Am gelabten  $\alpha$ -Casein haben unsere Untersuchungen als neue Amino-Endgruppe einzig Phenylalanin (1,8 Mole pro  $10^5$  g  $\alpha$ -Labcasein) ergeben. Wir dürfen das wohl als Beweis dafür ansehen, dass eine unspezifische Proteolyse, wie sie Casein durch grosse Labdosen erleidet<sup>8)</sup>, an unserm Präparat nicht in merklichem Umfange stattgefunden hat.

Arginin und Lysin sind im gelabten  $\alpha$ -Casein auch noch vorhanden. Ersteres findet sich in einer gegenüber dem ungelabten  $\alpha$ -Casein unveränderten Menge; die Lysin-Endgruppen dagegen zeigen bei der Labung eine signifikante Verminderung von 1,4 auf 0,8 Mol pro  $10^5$  g Protein. Der Zuwachs an neuen Endgruppen ist aber grösser als der Verlust bei den vorher vorhandenen. Das Total der Endgruppen pro  $10^5$  g  $\alpha$ -Casein steigt bei der Labung von 3,2 auf 4,4.

Das Auftreten neuer freier  $\alpha$ -Aminogruppen macht es sehr wahrscheinlich, dass die enzymatische Primärreaktion, welche den Caseinkomplex für Calcium fällbar macht, eine spezifische Proteolyse ist oder wenigstens eine solche einschliesst. Absolut Sicheres lässt sich hierüber allerdings nicht aussagen, solange nicht sämtliche Produkte der Spaltungsreaktion isoliert und auf ihre beidseitigen Endgruppen hin untersucht worden sind. Diese Arbeit ist begonnen und wir werden demnächst über erste Resultate berichten, die ein Makropeptid mit sehr bemerkenswerter Zusammensetzung betreffen.

Eine weitere Annahme, die durch unsere Endgruppenbestimmungen nahegelegt wird, ist die, dass durch das Lab nur ein Teil des als uneinheitlich erkannten  $\alpha$ -Caseins verändert worden ist. Sie steht in Übereinstimmung mit den neuesten Beobachtungen von *Waugh & von Hippel*<sup>22)</sup>, nach welchen das von ihnen entdeckte *k*-Casein, das in der Milch einen Komplex mit dem  $\alpha$ -Casein bildet, diejenige Fraktion ist, an der das Labferment angreift. Die beiden Autoren haben bisher nur von einer Zerlegung des  $\alpha/k$ -Komplexes und von einer Anreicherung des *k*-Caseins berichtet<sup>23)</sup>. Sobald reines *k*-Casein zugäng-

<sup>20)</sup> R. C. Warner, J. Amer. chem. Soc. **66**, 1725 (1944).

<sup>21)</sup> E. Cherbuliez & P. Baudet, Helv. **33**, 398 (1950).

<sup>22)</sup> D. F. Waugh & P. H. von Hippel, J. Amer. chem. Soc. **78**, 4580 (1956). Diese Arbeit wurde uns erst nach Abschluss der hier mitgeteilten Versuche bekannt.

<sup>23)</sup> In ihrer Fraktion S lagen 70% *k*-Casein neben 30%- $\alpha$ -Casein vor.

lich ist, sollen die hier mitgeteilten Endgruppenbestimmungen durch solche an dieser neu aufgefundenen Fraktion ergänzt werden.

Wir danken der Verwaltungskommission des *Theodor Kocher Instituts* in Bern, dass sie es dem einen von uns (H. W.) mit Mitteln der *Rockefeller Foundation* ermöglicht hat, während einiger Monate als Gast am genannten Institut zu arbeiten.

#### SUMMARY.

Quantitative determinations of the terminal amino groups of  $\alpha$ -casein before and after treatment with crystalline rennin were carried out using *Sanger's* method of labeling the free amino groups with dinitrophenyl residues. In native  $\alpha$ -casein the terminal amino acids were found to be lysine and arginine. In rennin treated  $\alpha$ -casein the same endgroups can still be detected, though lysine in smaller quantities. In addition a new terminal amino acid namely phenylalanine appears in the  $\alpha$ -paracasein.

In addition to chromatography a new method of determining N-terminal arginine has been successfully used during this work. Thereby DNP-arginine is determined directly in the mixture of DNP-amino acids by means of an optical method, using the colour reaction of *Sakaguchi*.

The results suggest, that the primary reaction in the rennet curdling of milk is a specific limited proteolysis. They further lead to the conclusion that  $\alpha$ -casein cannot be a homogeneous protein and that only a fraction of it is altered in this enzymatic reaction.

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

#### 44. Metallionen-Gleichgewichte und biologische Aktivität

von S. Fallab und H. Erlenmeyer.

(23. I. 57.)

Ausgehend von der Hypothese, dass zahlreiche biologische Wirkungen chemischer Verbindungen auf eine Beeinflussung von Fermentsystemen zurückzuführen sind<sup>1)</sup>, seien im folgenden einige mögliche Wirkungsmechanismen biologisch aktiver Stoffe diskutiert. Im Anschluss an diese allgemeinen Betrachtungen soll über das Komplexbildungsvermögen von strukturverwandten Verbindungen, von denen eine biologisch aktiv, die andere in den gleichen Testen inaktiv ist, berichtet werden.

<sup>1)</sup> H. Erlenmeyer, J. Bäumler & W. Roth, Helv. **36**, 941 (1953); s. auch S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv. **36**, 6 (1953).