Über die Polymerisation von β -Casein

von Ryoya NIKI und Shunrokuro ARIMA

*Institut für Milchwissenschaft, Landwirtschaftliche Fakultät,
Universität Hokkaido, Sapporo, Japan*

Eingegangen am 1. Juni 1968

The temperature-dependent polymerisation of β -casein was investigated by the method of light scattering, ultracentrifuge and optical rotatory dispersion. β -Casein used in the experiment was fractionated into β_{fast} -casein and β_{slow} -casein according to the method of Gehrke *et al.*

β_{slow} -Casein exhibited a strong tendency to associate with rising temperature, while β_{fast} -casein did not show such a property. The temperature-dependent polymerisation of β_{slow} -casein was extremely concentration dependent. On the other hand the results of optical rotatory dispersion indicated that β -casein changed structurally with the change in temperature, and the structural changes occurred may affect upon the ability of the polymerisation.

Der Caseinkomplex, der sich zum großen Teil also Micelle in der Milch befindet, hat neuerdings eine beachtliche Interesse auf dem Gebiet der Caseinchemie gefunden. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Caseinmicelle, wie Teilchengröße, innere Struktur, die Stabilität unter den verschiedenen Bedingungen, sind die große Gegenstand der Untersuchung geworden.

Man nimmt heute an, daß diese Micelle für sich ihre eigenen Löslichkeit haben kann, wenn sie sich unter einer bestimmten Bedingung findet, und daß zwischen den beiden Caseine, also Casein in einer dispersen Phase und dem in einer flüssigen Phase, ein Gleichgewicht entsteht, das wiederum durch den Milieufaktoren wie Temperatur also auch Salzkomponten beeinflusst werden kann. Zum Beispiel nimmt die Löslichkeit des Caseinkomplexes bei Zimmertemperatur ab und dagegen bei einer niedrigen Temperatur erheblich zu.¹⁾ Der Natur des reversiblen Gleichgewichts beruht hauptsächlich auf die Löslichkeit von β -Casein, da dies insbesondere bei der niedrigen Tem-

peratur seine Löslichkeit vergrößern kann.²⁾ Sullivan *et al.*³⁾ zeigten, daß β -Casein eine spezifische Tendenz in dem Zusammenhang mit der Temperatur besitzt. Nach ihnen soll β -Casein bei einer Temperaturerhöhung sich polymerisieren. Zum diesen Thema haben Payens und Markwijk⁴⁾ die temperaturabhängige Assoziation von β -Casein mit Hilfe der Ultrazentrifuge und Viskosimetrie untersucht. Aus ihren Versuchen ergab sich, daß β -Casein bei 4°C als ein Monomeren von einem Molekulargewicht ca 25,000 vorhanden ist, während dies bei 13.5°C miteinander zur fadenförmigen Polymerien umwandelt.

Seit einigen Jahren werden neue chromatographische und elektrophoretische Trennungsvorfahren auf dem Gebiet der Eiweißchemie entwickelt. Dank der Anwendung neuer Techniken zur Reinigung von β -Casein hat man einige neue Komponenten aus β -Casein

1) H. U. Boren und V. R. Wenner, *J. Dairy Sci.*, **44**, 1213 (1961).

2) T. L. McMeekin und M. L. Groves, "Fundamentals of dairy chemistry", The Avi Publishing Company, Inc., 1965, S. 375.

3) R. A. Sullivan, M. M. Fitzpatrick, E. K. Stanton, R. Annino, G. Kissel und F. Palermi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **55**, 455 (1955).

4) T. A. J. Payens und B. W. Markwijk, *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 517 (1963).

getrennt. Gehrke *et al.*⁵⁾ zeigten chromatographisch auf DEAE-Cellulose, daß β -Casein aus zwei Komponenten, β_{langsam} -Casein und β_{schnell} -Casein, bestand.

In vorliegender Arbeit werden die temperaturabhängige Eigenschaften von der auf DEAE-Cellulose fractionierten β -Caseine durch Lichtstreuungsmethode, optische Drehungsdispersion und Ultrazentrifuge untersucht.

UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Casein. Die Milchprobe wurden sofort nach dem Molken auf einer Temperatur von 2°C aufbewahrt und entrahmt. Für die Gewinnung des Gesamtcaseins stand die so entrahmte Milch zur Verfügung. Das β -Casein, das nach Hippschem⁶⁾ Verfahren bereitet wurde, auf DEAE-Cellulose nach Gehrkeschen⁵⁾ Methode zweimal gereinigt, und es mit Stärkegelelektrophorese definiert worden.

Lichtstreuungsmethode. Die Lichtstreuungsanlage, hergestellt von Shimazu A.G., hat eine zylindrische Lichtstreuungszelle, die mit einem Mantel versehen sind. Dieser Mantel ist dafür geeignet, die Proben-temperatur konstant zu halten. Vor der Messung der Lichtstreuung war β -Caseinlösung vollständig gegen Phosphatpuffer bei 2°C dialysiert und auf der Ultrazentrifuge mit 30,000 Touren in der Minute zentrifugiert, und anschließend dekantiert und mit Glassfilter filtriert worden. Einige vom diesen Filtrat stand für die Stickstoffbestimmung zur Verfügung, während sie zum großen Teil bis zur einen entsprechenden Konzentration verdünnt und mit Filter direkt in die Meßzelle hineinfltriert. Die Zelle wurde danach an die Anlage hingesezt. Die Wellenlänge für Intensitätsmessung der Streustrahlung war 435.8 m μ .

Die optische Drehungsdispersion. Einer Spektralpolarimeter, Yanagimoto-ORD-3 (Yanagimoto A.G., Kyoto), wurde zur Bestimmung der optischen Drehungsdispersion der Caseinlösung benutzt, wobei der Meßbereich für den sichtbaren und nehsichtbaren von 300 bis 500 m μ war. Die Meßergebnisse in Bereich von 300 bis

500 m μ wurde nach der Gleichung von Moffit-Yang^{7,8)} ausgewertet.

Die Gleichung ist

$$[m'] = a_0 \lambda_0^2 / (\lambda^2 - \lambda_0^2) + b_0 \lambda_0^4 / (\lambda^2 - \lambda_0^2)^2,$$

wobei λ die Wellenlänge ist, 212 m μ als der Wert von λ_0 benutzt wurde, $[m']$ die reduzierte mittlere Restrotation ist und die Parameter a_0 und b_0 aus einer graphisch gezeichneten Wertzahl von beiden Komponenten $[m'](\lambda^2 - \lambda_0^2)/\lambda_0^2$ und $\lambda_0^2/(\lambda^2 - \lambda_0^2)$ berechnet wurden können.

Ultrazentrifuge Analyse. Alle Messungen wurde auf der analytischen Hitachi-Ultrazentrifuge, hergestellt von Hitachi A.G., bei 60,000 UpM vorgenommen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Neuerdings werden die chromatographische und elektrophoretische Methode zur Trennung der Caseinkomponenten mit gutem Erfolg herangezogen. Gehrke *et al.*⁵⁾ berichteten ein Reinigungsverfahren von β -Casein durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose und zeigten, daß- β -Casein aus zwei Komponenten, β_{schnell} -Casein und β_{langsam} -Casein, besteht.

In Lauf der Zeit haben sich bereits mehrere Untersuchungen mit den Eigenschaften von β -Casein befaßt. Wie besonders von Payens und Markwijk⁴⁾ und Sullivan *et al.*³⁾ veröffentlicht worden ist, hat β -Casein, das nach dem Verfahren von Hipp⁶⁾ oder Wanner⁹⁾ getrennt wird, eine merklliche Tendenz, sich bei einer Temperaturerhöhung zu assoziieren, wobei dieser Assoziationsgrad auch von der Konzentration des β -Caseins abhängt.

In Abb. 1 wird der Einfluß der Temperatur auf den beiden auf DEAE-Cellulose fraktionierten β -Caseine dargestellt. Aus diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, daß ein großer Unterschied zwischen β_{schnell} -Casein und β_{langsam} -Casein besteht. β_{langsam} -Casein besitzt also die spezifische Natur, daß es mit

5) C.W. Gehrke, W.C. Freeark, H.Y. Oh und P.W. Chun, *Anal. Biochem.*, **9**, 423 (1964).

6) N.J. Hipp, M.L. Groves, H.J. Custer und T.L. McMeekin, *J. Dairy Sci.*, **35**, 272 (1952).

7) W. Moffit, *J. Chem. Phys.*, **25**, 466 (1965).

8) W. Moffit und J.T. Yang, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **42**, 596 (1956).

9) R.C. Wanner, *J. Amer. Chem. Soc.*, **66**, 1725 (1944).

ABB. 1. Einfluß der Temperatur auf die reduzierte Streuintensität der auf DEAE-Cellulose fraktionierten β -Caseine, wobei R_{90} die reduzierte Streuintensität unter einem Winkel von 90° ist, die für die Streuung des Lösungsmittels korrigiert wird.

Die Konzentration von β_{schnell} -Casein ist 20.7 mg/ml und die von β_{langsam} -Casein ist 21.2 mg/ml in 0.02 M Phosphatpuffer, pH 7.0.

der Temperaturerhöhung assoziiert wird, aber β_{schnell} -Casein zeigte keine solche Tendenz. Da die Größe oder die Gestalt der Proteinmoleküle durch viele Faktoren, wie die Temperatur, die Ionenstärke, pH usw. beeinflusst werden und einige Proteine unter gegebenen Bedingungen verschiedene aggregierte oder dissoziierte Formen haben können, ist es nicht leicht zu erklären, welche Faktoren Wirkung auf diesen Unterschied ausüben können. Gehrke *et al.*⁵⁾ untersuchten die physikalisch-chemischen Eigenschaften beider Caseine und konnten die Unterschiede in dem Phosphorgehalt, der Empfindlichkeit gegen Calciumionen oder der Assoziation-dissoziation in Gegenwart von Kaliumchlorid feststellen. Es ist auch wahrscheinlich, daß die beide Caseine verschiedene elektrische Ladung und eine unterschiedliche Größe haben, da sie eigentlich durch Chromatographie auf DEAE-Cellulose getrennt werden und durch Stärkegelelektrophorese

charakterisiert werden können.

Wie in Abb. 1 gezeigt, kann unter Umstände β_{langsam} -Casein sich bei einer Temperaturerhöhung polymerisieren. Um die temperaturabhängigen Eigenschaften noch eingehend festzustellen, wurde der Konzentrationsinfluß von β_{langsam} -Casein auf die Polymerisierung untersucht (Abb. 2). Die gewonnenen Ergebnisse

ABB. 2. Konzentrationsabhängigkeit von β_{langsam} -Casein von seiner temperaturabhängigen Polymerisation, wobei R_{90} die reduzierte Streuintensität unter einem Winkel von 90° ist, die für die Streuung des Lösungsmittels korrigiert wird.

Die Konzentration der β -Caseinlösung. A: 23.0 mg/ml, B: 11.5 mg/ml, C: 5.75 mg/ml, D: 2.85 mg/ml, E: 1.43 mg/ml, F: 0.75 mg/ml in 0.02 M Phosphatpuffer, pH 6.5.

stimmen mit der Angabe von Payens und Markwijk⁴⁾ gut überein. Um diese Erscheinung zu deuten, verglich Payens¹⁰⁾ den Sedimentationskoeffizient der Polymere von β -Casein mit dem der verschiedenen Makromoleküle, und berichteten, daß die große Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten der Polymere auf die ihren stäbchenartigen oder schraubenförmige Struktur zurückzuführen ist.

Aus dieser Tatsache zeigten die in Abb. 2

10) T. A. J. Payens, *J. Dairy Sci.*, **49**, 1317 (1966).

gewonnene Ergebnisse, daß der Konzentrations-
effekt von β_{langsam} -Casein auf seine temperatur-
abhängige Polymerisation zum Teil auf die
Form des Moleküls vermutlich zurückzuführen
ist.

Zur Ermittlung des Polymerisationsverfah-

rens, wurde die Messung der Sedimentation
von β_{langsam} -Casein in der analytischen Ultra-
zentrifuge durchgeführt. Wie in Abb. 3 gezeigt,
bestand β_{langsam} -Casein aus einer langsamer
sedimentierenden Hauptkomponente und einer
schneller sedimentierenden Nebenkompone

ABB. 3. Sedimentationsbilder von β_{langsam} -Casein bei verschiedener Temperatur. Die Proteinkonzentration ist ein Prozent in 0.02 M Phosphatpuffer, pH 7.0. Drehungszahl 60,000 Upm.

Die Bilder wurden 82 Min und 91 Min nach dem Erreichen der maximalen Geschwindigkeit aufgenommen. Der Pfeil zeigt die Richtung der Sedimentation.

bei 5°C. Mit der Temperaturerhöhung nahm die schneller sedimentierende Komponente zu und die langsamer sedimentierende Komponente dagegen ab. Diese Tatsache spricht deutlich für die Bildung der Polymere mit Steigung der Temperatur. Nach der Angabe von Payens und Markwijk⁴¹ sind β -Caseine in Lösung als die Monomeren von Molekulargewicht 25,000 bei 4°C und pH 7.5 vorhanden und werden die fadenförmigen Polymeren bei 13.5°C gebildet.

Um die Strukturänderungen des Moleküls in Abhängigkeit von der Temperatur zu erfassen, wurde die optische Drehungseigenschaft von β_{langsam} -Casein untersucht, da die optische Drehungsdispersion eine sehr günstige Methode zur Ermittlung der Konformationsänderungen oder der relativen Änderungen in der Sekundärstruktur und der Raumstruktur der Proteinen und der Peptiden ist.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich ist, wurde keine deutliche Änderung im Moffit-Yangschen Parameter b_0 mit der Temperatur beobachtet und war der Wert fast Null in allen Fällen, während der Wert des Parameter a_0 dagegen zunahm. Herskovits¹¹⁾ untersuchte die Konfor-

mation der drei Caseinkomponenten (α -, β - und κ -Casein) und berichteten, daß die optische Drehungskonstante und der Wert von a_0 mit der Kühlung der Caseinlösung abnahm und die größte Änderung der Parameter a_0 in β -Caseinlösung beobachtet wurde.

Es läßt sich nicht leicht erklären, was für eine Beziehung zwischen der Änderung des Parameters a_0 und der Polymerisationsfähigkeit von β -Casein besteht. Die Moffit-Yangschen Parameter (a_0 und b_0) spiegeln die regelmäßige Struktur im Protein oder im Peptid wider, wobei der Wert des Parameters a_0 nicht nur von der regelmäßigen Struktur, sondern auch von der Art seiner Aminosäurenresten oder des Lösungsmittels leicht beeinflusst wird.¹²⁾

Nach Hamaguchi¹³⁾ kann Protein eine Möglichkeit haben, eine andere regelmäßige Struktur als α -Helix in seinem Molekül zu besitzen, wenn es den kleinen Wert der optischen Drehungskonstante, sowie a_0 einen kleinen negativen Wert und b_0 Null besitzt. Im allgemeinen nimmt man an, daß keine angeordnete Struktur wie α -Helix im Caseinmolekül sich befindet,¹⁴⁾ aber die Angabe von Hamaguchi ist von Bedeutung, wenn man den Wert des Moffit-Yangschen Parameters und der optischen Drehungskonstante¹¹⁾ von β -Casein ins Auge faßt. Über dieses Problem berichtete Garnier¹⁵⁾ einen interessanten Befund, daß ein negativer Cotton Effekt im entfernt ultravioletten Gebiet in der β -Caseinlösung beobachtet wurde, und nahm an, daß eine spezifische Struktur, polyl-prolinartige Struktur, im β -Casein vorhanden ist und sich mit der Temperaturerhöhung verändert.

Aus diesem Zusammenhang als auch aus den in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse, daß nur der Parameter a_0 mit der Temperatur änderte, kann gesagt werden, daß β_{langsam} -Casein

ABB. 4. Einfluß der Temperatur auf die Moffit-Yangsche Parameter, wobei der Wert von a_0 durch die Abschnitte auf Ordinate und der von b_0 durch die Neigung der Kurve angegeben werden, und die kleine Abbildung zeigt a_0 -Temperatur Kurve.

Proteinkonzentration ist 3.97 mg/ml in 0.02 M Phosphatpuffer, pH 7.0.

11) T.T. Herskovits, *Biochemistry*, **5**, 1018 (1966).

12) K. Hamaguchi, "Tanpakushitu no rittai-kozo", Kyoritu Shuppan, Tokyo, 1967, S. 13.

13) K. Hamaguchi, "Tanpakushitu no rittai-kozo", Kyoritu Shuppan, Tokyo, 1967, S. 17.

14) H. A. McKenzie, *Advan. Protein Chem.*, **22**, 55 (1967).

15) J. Garnier, *J. Mol. Biol.*, **19**, 586 (1966).

mit der Temperaturveränderung strukturell beeinflusst und seine Strukturänderung irgendwie mit seiner Polymerisationsfähigkeit zusammenhängt.

Herrn Prof. S. Sugai haben wir für zahlreiche wert-

volle Ratschläge und Hilfeleistung bei der Untersuchungen über die optische Drehungsdispersion an dieser Stelle herzlich zu danken, und dem Kultusministerium danken wir für finanzielle Unterstützung der Arbeit.