



Title	ÜBER DIE ANWENDUNG DER CALCIUMEMPFLINDLICHKEITSPRÜFUNG AUF DIE UNTERSUCHUNG DER LABWIRKUNG
Author(s)	NIKI, Ryoya; CHANG, Kang Kang; ARIMA, Shunrokuro
Citation	Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University, 55(4), 421-428
Issue Date	1968-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12829
Type	bulletin (article)
File Information	55(4)_p421-428.pdf



[Instructions for use](#)

ÜBER DIE ANWENDUNG DER CALCIUMEMPFLINDLICHKEITSPRÜFUNG AUF DIE UNTERSUCHUNG DER LABWIRKUNG

Ryoya NIKI, Kang Kang CHANG
und Shunrokuro ARIMA

(Milchwissenschaftliches Institut, Landwirtschaftliche Fakultät,
Universität Hokkaido, Sapporo, Japan)

Eingegangen am 5. Dezember 1967

EINLEITUNG

Das Caseinteilchen ist sehr empfindlich gegenüber Änderungen des zweiwertigen Kationengehalts von Milch, und die Stabilität und die Form des Caseinkomplexes werden von der Veränderung des Salzgehaltes beeinflusst (5).

Man weiss heute, dass Calciumionen eine wichtige Rolle für die Stabilität oder die Formung von Caseinmicellen in der Milch spielen.

Auf der anderen Seite bezieht sich Calcium auf die Labgerinnung.

Der Labungsprozess der Milch besteht aus drei Reaktionen: die Glykomakropptiden werden zunächst abgespalten, dann findet die Labgerinnung statt und Caseinkomponenten werden schliesslich mit Lab unter Bildung der kleineren Peptide zerlegt. Ist kein Calcium in der Milch, so findet die Labgerinnung überhaupt nicht statt.

Bei der Behandlung des Caseins mit Lab ist der wichtigste Unterschied zwischen nativem Casein und para-Casein die Zunahme der Empfindlichkeit gegen zweiwertigen Kationen wie Calciumionen.

In dieser Arbeit betrachten wir diesen spezifische Unterschied. Wir untersuchten den Lab-reaktionsprozess mit Hilfe von Calciumempfindlichkeitsprüfung, die verwertet wurde, um die Stabilität von Caseinmicellen festzustellen. Hier nennen wir die Methode Calciumempfindlichkeitsprüfung. Wir untersuchten, ob die Methode, die verwendet wurde, um die Stabilität von Caseinmicellen festzustellen, für die Labfähigkeitsmessung oder die Untersuchung des Lab-reaktionsprozesses verwendet werden kann.

MATERIAL UND METHODIK

Casein: Die Milch wurde von dem landwirtschaftlichen Betrieb der

Universität Hokkaido bekommen und sofort nach dem Molken bei einer Temperatur von 2°C aufbewahrt.

Durch den Zusatz von 0.5N HCl wurde Casein aus der Magermilch ausgefällt. Der bekommene Niederschlag wurde in das deionisierten Wasser zerstreut, durch tropfenweisen Zusatz von 0.5 NaOH gelöst und wieder mit 0.5N HCl ausgefällt. Dieses Verfahren wurde sechs-oder siebenmal wiederholt. Der zuletzt bekommene Niederschlag wurde gut mit deionisiertem Wasser gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet.

Nach der Methode von ERNSTROM (3) wurde das Labenzym aus dem Labpulver von Hansen gereinigt. Die Labfähigkeit wurde nach dem Verfahren von BERRIGD (2) bestimmt.

Das Verfahren der enzymatischen Reaktion: Die Caseinlösung wurde hergestellt, in dem zunächst das Caseinpulver in dem deionisierten Wasser zerstreut, und dann mit 0.5N NaOH zwischen pH 7.0 und 8.0 gelöst wurde. Diese Caseinlösung wurde gegen das deionisierten Wasser 24 Stunden lang bei 2°C dialysiert, mit 0.1N HCl an pH 6.0 eingestellt, filtriert und schliesslich mit Lab behandelt. Bei der Behandlung mit Labenzym wurde die Caseinlösung in einem Wasserbad entsprechender Temperatur gestetelt und eine Lablösung, die 4.0 Lab Einheit hatte, wurde der Caseinlösung im Verhältnis von 100 ml Caseinlösung zu 1 ml Lablösung zugefügt. Die Labreaktion wurde bei 80°C und 10 Minuten in dem Wasserbad gestoppt.

Calciumempfindlichkeitsprüfung: Wie in Tabelle 1 gezeigt, wurde das gelabte Casein zur Calciumchlorid enthaltenden Lösung zugefügt, gut gemischt und 20 Minuten lang in ein Wasserbad von 20°C gestellt. Dann wurde die

TABELLE 1. Prüfungsmittel für Calciumempfindlichkeitstest

0.05 M CaCl Lösung (ml)	Entionisiertes Wasser (ml)	1% Casein Lösung (ml)	Pufferlösung (pH 7) (ml)	End-Konzentration von CaCl ₂ (mM)
0.0	3.0	1.0	1.0	0.0
0.1	2.9	1.0	1.0	1.0
0.2	2.8	1.0	1.0	2.0
0.3	2.7	1.0	1.0	3.0
0.4	2.6	1.0	1.0	4.0
5.5	2.5	1.0	1.0	5.0
0.6	2.4	1.0	1.0	6.0
0.7	2.3	1.0	1.0	7.0
0.8	2.2	1.0	1.0	8.0
0.9	2.1	1.0	1.0	9.0
1.0	2.0	1.0	1.0	10.0

Messung der Trübheit der Probe mit einem Spektralphotometer ausgeführt, wobei wurde die Stärke der Trübheit als die Intensität des Durchlichts bei 610 m μ Wellenlänge gezeigt.

Die Messung des Gehalts an Nicht-Protein-Stickstoff (NPN): 5 ml gelabter Caseinlösung wurde 5 ml 24-prozentiger Trichloressigsäure zugesetzt, sofort gut gemischt, 5 Stunde lang bei 2°C in den Kühlschrank gestellt, 30 Minuten lang mit 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und filtriert. In aliquoten Teilen der Filtrate wurde der Stickstoff als NPN bestimmt.

RESULTAT UND DISKUSSION

Wenn Casein mit Lab behandelt wird, wird es zu para-Casein umgewandelt, das in Gegenwart von Calciumion gerinnt. Die Labgerinnung ist ein komplizierter Prozess, der die enzymatische und nicht enzymatische Reaktion enthält: die sogenannte Primärreaktion und Sekundärreaktion.

In der Sekundärreaktion war para-Casein besonders empfindlich gegenüber Veränderung der Konzentration von Calciumionen und es findet leicht die Koagulation statt. Fig. 1 zeigte die Calciumempfindlichkeitskurve von Casein,

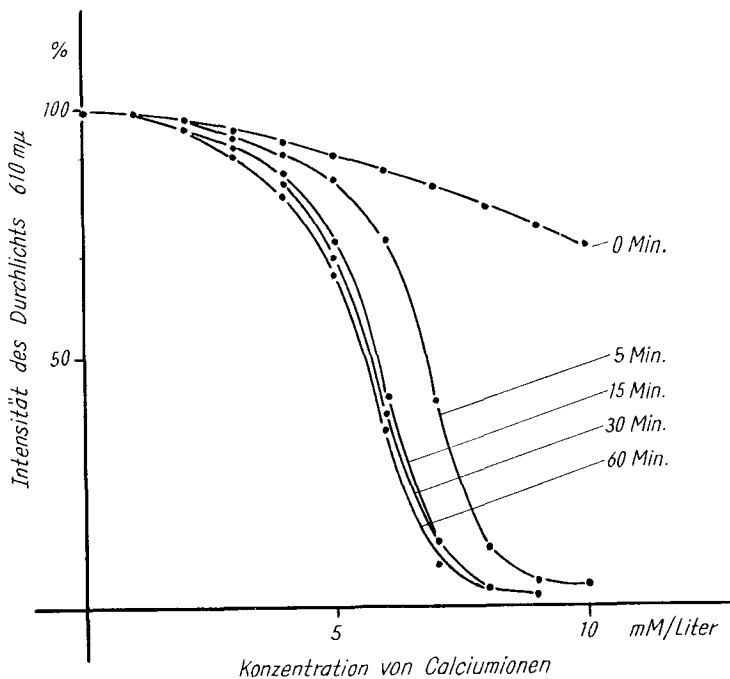


Fig. 1. Die Einfluß der Labwirkung auf Calciumempfindlichkeit von Casein.

das bei 30°C und pH 6.0 mit Lab behandelt werde. Mit der Reaktionszeit nahm die Calciumempfindlichkeit zu, besonders wurde eine drastische Änderung in der frühen Reaktionsstufe (0–15 Min.) beobachtet.

Das native Casein ist auch mit verhältnismässig höherem Calciumionengehalt leicht trübe geworden. Die Caseinkomponenten zeigen verschiedene Empfindlichkeit gegen Calciumionen. LINDERSTROM-LANG schlug vor (4), dass eine Fraktion der Caseinkomponenten als ein Schutzkollid wirken solle und dass sie die anderen Komponenten gegen die Fällung durch Calciumionen stabilisiere. Wenn das Lab diese Schutzfraktion angriff, wurde ihre Stabilisierungsfähigkeit zerstört und die Fällung oder die Koagulation der anderen Komponenten in Gegenwart von Calciumionen folgte. WAUGH und VON HIPPEL (6) fraktionierten die Caseinkomponenten auf den Unterschied ihrer Löslichkeit in der Calciumchloridlösung und identifizierten die sehr wichtige Fraktion k-Casein, die Nebenfraktion von α -Casein, die gegen die Fällung durch Calciumionen nicht empfindlich war, und fanden, dass sie die von LINDERSTROM-LANG (4) als Schutzkolloid gedachte Fraktion wurde und eine wichtige Rolle für die Stabilisierung von Caseinmicellen spielte. Wenn man k-Casein durch Lab angreift, wird seine Fähigkeit, die Caseinmicellen zu stabilisieren, zerstört und durch die Calciumionen gerinnen die Caseinmicellen. Aus Fig. 1 ergibt sich klar, dass mit der Reaktionszeit die Löslichkeit des gelabten Casein in der Calciumchloridlösung abnimmt, und schließlich kann die Koagulation beobachtet werden.

Der Versuch in Fig. 2 wurde ausgeführt, um den Zustand der Trübe, der in dem vorigen Experiment beobachtet wurde, zu untersuchen. Die Proben, die unter den in Fig. 1 angewandten Bedingungen hergestellt wurden, wurden 30 Minuten lang mit zehntausend Umdrehungen in der Minuten zentrifugiert, um sie in den Fällungsteil und das Filtrat zu trennen, und die Absorption des Filtrates bei 280 $m\mu$ zu messen. Mit der Reaktionszeit nahm die Absorption des Filtrates ab, besonders bis 15 Minuten war die Abnahme rasch. Diese Tatsache zeigte, daß, wenn das Lab auf Casein wirkt, die Micellengrösse wächst, das gelabte Casein leicht durch Calciumionen Aggregation eintritt und die Menge des Niederschlags zunimmt. Nach 15 Minuten zeigten die Absorptionskurven von über 8 mM Calciumionenkonzentration ein horizontales Plateau. Das bedeutet, dass nur die Substanzen, die verhältnismässig niedriges Molekulargewicht hatten, gegen Calciumionen nicht empfindlich sind und nicht zentrifugiert wurden, in dem Filtrat blieben und ihre Menge nach 15 Minuten konstant geworden war.

Diese Erscheinung bezieht sich vielleicht auf die Tatsache, dass bei der Einwirkung von Lab auf Milch oder Caseinlösung Proteinbruchstücke abgespalten

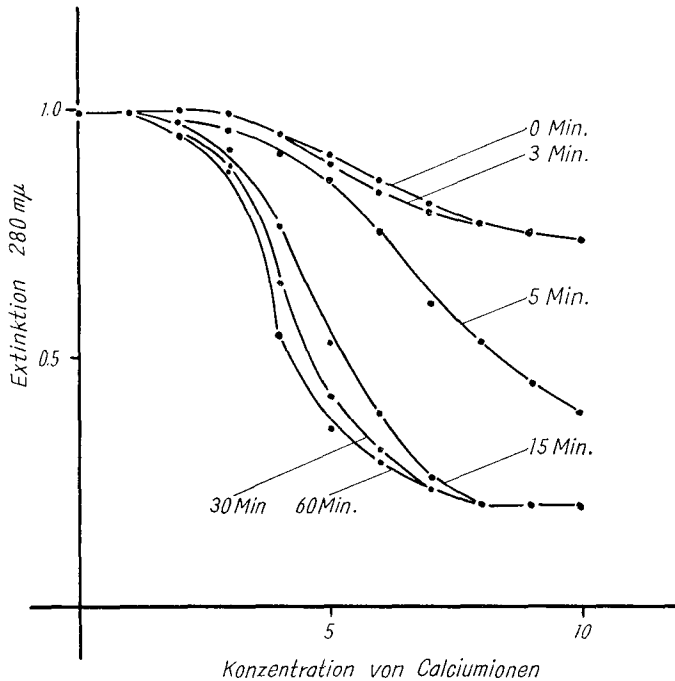


Fig. 2. Die Stabilität des gelabten Casein in CaCl_2 Lösung

werden, die in Trichloressigsäure im Gegensatz zum Casein löslich sind. Die Labgerinnung der Milch besteht mindestens aus zwei verschiedenen Vorgängen, der Primärreaktion und der Sekundärreaktion. Bei der Primärreaktion verändert das Lab das Casein chemisch und spaltet die leicht löslichen Stickstoffverbindungen aus Casein ab, die durch Trichloressigsäure nicht mehr fallbar sind. Die Fragmente nennt man Nicht-Protein-Stickstoff (NPN) und ALAIS *et al.* (1) zeigten, dass die Änderung von NPN den Verlauf der Primärreaktion der Labung ergab, und untersuchten die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Primärreaktion durch die Messung von NPN.

Zur Messung der Labfähigkeit haben viele Forscher verschiedene Methoden gefunden, aber die ideale Untersuchungsmethode fehlt noch.

Gegenwärtig wird die Messung der Freisetzung von NPN am häufigsten angewendet, um besonders den Verlauf der Primärreaktion der Labung zu untersuchen.

In Fig. 3 wurde die Beziehung zwischen der NPN/Zeitkurve und Calciumempfindlichkeitskurven gezeigt. Die Kurven in Fig. 3 lassen erkennen, dass die Zunahme von NPN und der Calciumempfindlichkeit des gelabten Caseins

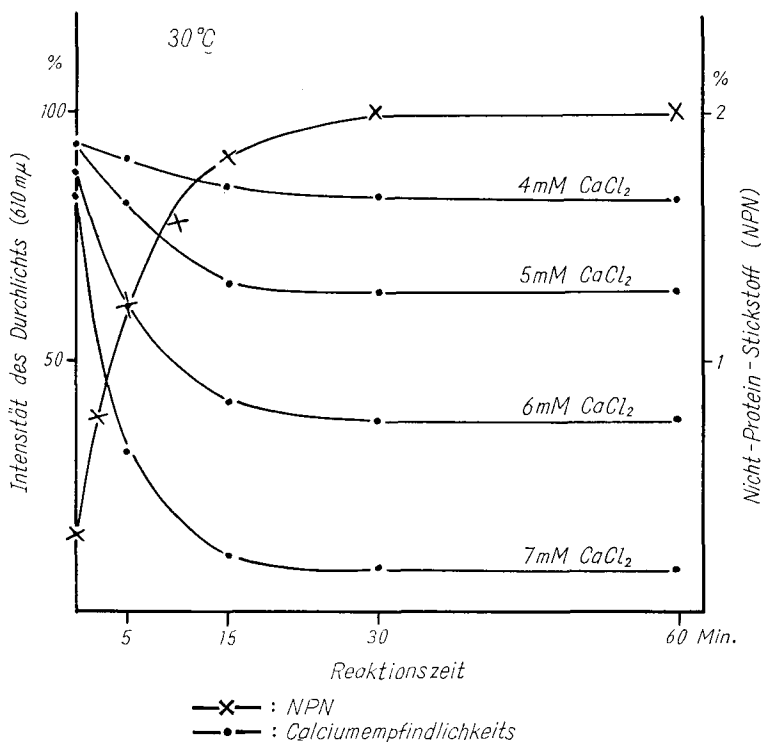


Fig. 3. Beziehung zwischen der NPN/Zeitkurve und Calciumempfindlichkeitskurven

ganz ähnlich verläuft, das heisst, die kurve von NPN steigt zu Beginn stark, dann von 15 bis 30 Minuten Reaktionszeit verhältnismässig langsam an und verläuft schliesslich fort parallel zur Zeitachse, während die Calciumempfindlichkeit mit dem gleichem Prozess abnimmt

Betrachtet man die Korrelation zwischen der NPN/Zeitkurve und die Calciumempfindlichkeitskurve, so ergibt sich eine Gerade (Fig. 4).

Aus diesem Resultat ergibt sich die Möglichkeit, die Calciumempfindlichkeitsprüfung statt der Messung von NPN anzuwenden, um die Veränderungen des Caseins während der Labung festzustellen.

Ausserdem hat diese Methode einen Vorteil, dass man mit dem gleichen Probe den Zustand des gelabten Caseins in Gegenwart von Calciumionen durch Zentrifugierung untersuchen kann.

Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Calciumempfindlichkeitsprüfung eine gültige Methode ist, um die Eigenschaften des Labs zu untersuchen.

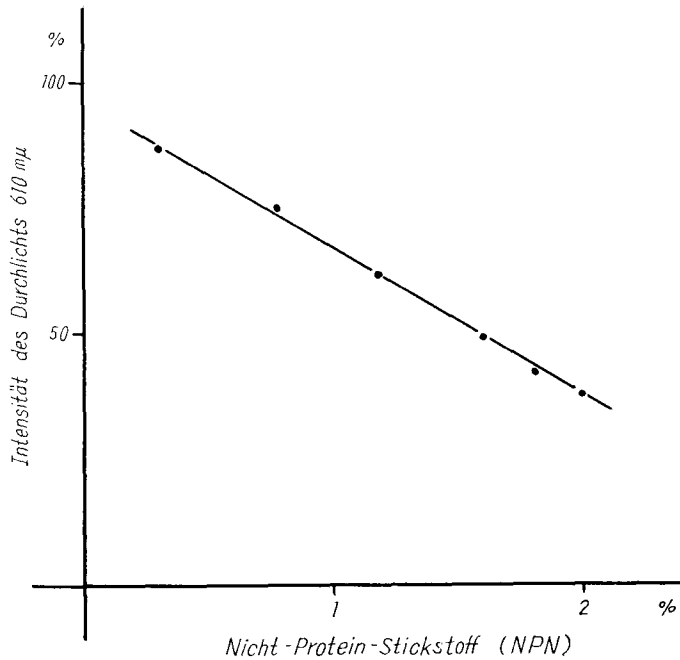


Fig. 4. Korrelation zwischen der NPN/Zeit-kurve und die Calciumempfindlichkeitskurve.

Zusammenfassung

Bei der Behandlung des Caseins mit Lab ist der wichtigste Unterschied zwischen nativem Casein und para-Casein die Zunahme der Empfindlichkeit gegen zweivalenten Kationen. In dieser Arbeit wurde es untersucht, ob die Calciumempfindlichkeitsprüfung für die Labfähigkeitsmessung verwendet werden kann.

Mit der Reaktionszeit nahm die Calciumempfindlichkeit des gelabten Casein zu, besonders wurde eine drastische Änderung in der frühen Reaktionsstufe beobachtet. Die Zunahme von NPN und der Calciumempfindlichkeit des gelabten Caseins ähnlich verläuft.

Aus der Beziehung zwischen der NPN/Zeit-kurve und Calciumempfindlichkeitskurven ergibt sich die Möglichkeit, die Calciumempfindlichkeitsprüfung statt der Messung von NPN anzuwenden, um die Veränderungen des Caseins während der Labung festzustellen.

Literatur

- 1) ALAIS, C., MOCQUOT, G., NITSCHMANN, H. und ZAHLER, P. 1953, *Helv. Chim. Acta*, 36, 1955.
- 2) BERRIGE, N. J. 1945, *Biochem. J.* 39, 179.
- 3) ERNSTROM, C. A. 1958, *J. Dairy Sci.* 41, 1663.
- 4) LINDERSTROM-LANG, K. 1929, *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg*, 17, No. 9.
- 5) WAUGH, D. F. 1958, *The Faraday Society Discussions*, 25, 186.
- 6) WAUGH, D. F. und VON HIPPEL, P. H. 1956, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4576.