

Die *alkalische Verseifung* des hochpolymeren Glykol-esters ist nicht als Reaktion zweiter Ordnung zu beschreiben. Die «Verseifungskonstante» nimmt wie beim Pektin¹ während der Verseifung sehr stark ab. Dies ist auf eine ansteigende negative Aufladung der Makromoleküle zurückzuführen. – Auch gegenüber *Säuren* zeigt der Glykolester eine ähnliche Stabilität wie der natürliche Methylester.

Wegen des Vorhandenseins primärer Hydroxylgruppen reagiert der Glykolester in Gegenwart von Mineralsäuren bedeutend rascher mit *Formaldehyd*² als Pektin. Durch Reaktion mit dem bifunktionellen Formaldehyd kommt es zu Brückenbildungen zwischen den Fadenmolekülen (homöopolare Valenzbindungen). Diese Brücken können beim Glykolester durch verdünntes Alkali bei Zimmertemperatur hydrolysiert werden, da sich die primären Hydroxylgruppen in den esterartig gebundenen Seitenketten befinden. Beim Pektin sind nur sekundäre Hydroxyle vorhanden, die direkt an der Hauptvalenzkette sitzen.

Die Glykol- und Glycerinester der Polygalakturonsäure werden durch das Enzym *Pektase*, das den natürlichen Methylester zu verseifen vermag, nicht hydrolysiert. Auch Lipasen scheinen diese Ester nicht anzugreifen. – Die *Pektinase*, die die glykosidischen Bindungen der Polygalakturonsäure spaltet, baut den Glykolester ähnlich wie Pektin³ um so langsamer ab, je höher der Veresterungsgrad ist. Völlig veresterte Polygalakturonsäure wird nicht enzymatisch degradiert.

Tabelle III

Abbau eines Glykolesters der Polygalakturonsäure durch das Enzym *Pektinase*

Pro 65 cm³ Lösung je 1,31 Milliäqu. Polyuronsäure und 10 mg Pektinasepräparat (Pectasin, USA.). – $p_H = 3,9$ (Zitratpuffer). 20° C. 24 Stunden Enzymeinwirkung

Veresterungsgrad %	Abnahme der spezifischen Viskosität durch Pektinase %
100	0,0
95 (ca.)	28,0
85	41,2
70	62,3
54	81,4
0	86,5

Auch *Polyglukuron-* und *Polymannuronsäuren* bilden mit Epoxyden Ester. – Die Untersuchungen werden weitergeführt.

H. DEUEL

Agrikulturchemisches Institut der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, den 4. Februar 1947.

Summary

Polygalacturonic acids (pectic acids) can easily be esterified by epoxides (ethylene oxide, 2,3-epoxy-1-propanol, epichlorhydrin, etc.) in the presence of water. Under favorable conditions the degradation of the macromolecules is negligible. Some properties of the

¹ DEUEL, Ber. schweiz. bot. Ges. 53, 219 (1943). – LINEWEAVER, Amer. chem. Soc. 67, 1292 (1945).

² Untersuchungen am hiesigen Institut über Reaktionen von Formaldehyd mit Pektinstoffen sollen demnächst veröffentlicht werden.

³ JANSEN und MACDONNELL, Arch. Biochem. 8, 97 (1945). – PALLMANN, MATUS, DEUEL und WEBER, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 65, 633 (1946).

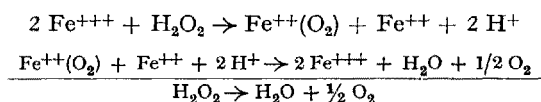
glycol esters of polygalacturonic acid which are similar to those of the methyl esters of polygalacturonic acid (pectinic acids) are described. The glycol and glycerol esters, however, are not saponified by the enzyme pectase. These compounds react much more rapidly with formaldehyde than pectinic acid which does not possess primary hydroxyl groups.

Über den Wirkungsmechanismus der Katalase

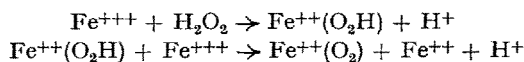
Am hiesigen Laboratorium durchgeführte Versuche¹ zeigten in teilweiser Übereinstimmung mit älteren Befunden², daß sowohl Oxydations- als auch Reduktionsmittel imstande sind, die Aktivität von Blutkatalase beträchtlich zu hemmen. Obwohl uns bisher kristallisierte Pferde- oder Rinderleberkatalase aus zeitbedingten Gründen nicht zugänglich waren und wir daher unsere Versuche nicht mit hochgereinigten Präparaten verifizieren konnten, halten wir es doch für unwahrscheinlich, daß die von uns gefundenen spezifischen und gut reproduzierbaren Hemmeffekte auf Verunreinigungen beruhen.

Die beschriebenen Wirkungen lassen sich mit den zurzeit vorherrschenden Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der Katalase³ sehr schwer vereinen. Nach der Anschauung von SUMNER findet bei der Katalasewirkung kein Valenzwechsel statt. Die geschilderten Hemmeffekte lassen sich aber gerade mit der Vorstellung eines Valenzwechsels besonders einfach deuten: Oxydationsmittel würden das Katalaseisen auf der Ferristufe festhalten, während Reduktionsmittel eine Reoxydation der Ferrokatalase zur Ferristufe verhindern sollten. Diesen Anschauungen wird am ehesten die Formulierung von KEILIN und HARTREE⁴ gerecht, gegen die aber aus verschiedenen Gründen schwerwiegende Einwände gemacht wurden⁵.

Die meisten Bedenken ließen sich aber durch die Vorstellung zerstreuen, daß die Ferrokatalase (oder ein Teil ihres Moleküls) ähnlich wie das Hämoglobin imstande sei, ein Molekül Sauerstoff locker gebunden anzulagern. Die Formulierung von KEILIN und HARTREE wäre dann wie folgt zu modifizieren:



Für den Elementarvorgang ist hier nur die Kombination von zwei Fe^{+++} -Zentren mit einem H_2O_2 nötig, was auch nach einem Vorschlag von L. EBERT⁶ als Stufenreaktion (eventuell über Säuredissoziation von H_2O_2):



aufgefaßt werden kann. Damit würde das von WEISS und MALHERBE gegen die Auffassung von KEILIN und

¹ O. HOFFMANN-OSTENHOF und E. BIACH, Mh. Chem. 76, 319 (1947); vgl. auch Exper. 3, 108 (1947).

² A. ALEXEJEV und K. RUSSINOWA, Bull. Inst. Rech. biol. Perm 6, 425 (1928); vgl. auch die Zusammenstellung älterer Befunde bei K. G. STERN, Z. physiol. Chem. 209, 176 (1932).

³ J. B. SUMNER, Advances in Enzymology 1, 163 (1941); H. THEORELL, Erg. Enzymforsch. 9, 230 (1943).

⁴ KEILIN und HARTREE, Proc. roy. Soc. (London), Ser. B, 124, 397 (1938).

⁵ J. WEISS und H. WEIL-MALHERBE, Nature (London) 144, 866 (1939). – F. J. JOHNSON und K. L. VAN SCHOUWENBURG, ib. 144, 634 (1939).

⁶ Persönliche Mitteilung.

HARTREE geäußerte Bedenken, daß molekulare Zusammenstöße sehr hoher Ordnung notwendig wären, für die neue Modifikation der Formulierung gegenstandslos. Ebenso würde der andere Einwand derselben Autoren, nämlich, daß die Wirkung anaerob autokatalytisch ansteigen müßte, in dem Maße, in dem mehr und mehr Sauerstoff gebildet wird, entkräftet, da ja jedes Molekül Ferrokatalase den zur Inganghaltung der Reaktion notwendigen Sauerstoff molekular gebunden mit sich führen würde.

Es soll hier ausdrücklich betont werden, daß die obige Formulierung, die ja zu einem großen Teil auf den Überlegungen von KEILIN und HARTREE sowie früherer Autoren beruht, hier nur zur Diskussion gestellt werden soll. Über ihre Richtigkeit werden Untersuchungen mit den verschiedenen für Eisenproteide anwendbaren Methoden, wie spektroskopische und magnetochemische Messungen, entscheiden müssen. Die Deutung derartiger Befunde kann aber durch die Möglichkeit erschwert werden, daß die vier im Katalasemolekül vorhandenen Eisenatome nicht gleichwertig sind und in verschiedener Weise am Reaktionsmechanismus teilnehmen.

OTTO HOFFMANN-OSTENHOF

I. Chemisches Laboratorium der Universität Wien, den 23. Dezember 1946.

Summary

The author proposes a new formulation of the mechanism of action of the enzyme catalase.

Elektrophoretische Differenzierung von Säure- und Labcasein

Es ist bekannt, daß kalziumfreie Präparate von Casein, das durch Säure, und von solchem, das durch Lab aus Milch abgeschieden wurde, mit den gewöhnlichen analytischen Methoden nicht mehr eindeutig differenziert werden können. Kolloidchemisch sind die beiden Caseine jedoch, wie längst bekannt, sehr leicht und absolut eindeutig zu unterscheiden, indem Labcasein aus annähernd neutralen Lösungen durch Kalziumionen in einer bestimmten kleinen Minimalkonzentration nahezu quantitativ ausgefällt wird, während Lösungen von Säurecasein unter gleichen Bedingungen nur etwas trüber werden.

Wir haben nun untersucht, ob Säure- und Labcasein aus Kuhmilch bei der Elektrophorese Unterschiede zeigen. O. MELLANDER¹ scheint als erster gezeigt zu haben, daß sich Casein bei der elektrophoretischen Wanderung gegen die Anode aufspaltet. Er fand zwei Fraktionen und bezeichnete die schnellere als α -, die langsamere als β -Casein. α -Casein überwiegt mengenmäßig etwa 4:1. R. C. WARNER² hat diese Ergebnisse bestätigt und in einer ausführlichen Arbeit durch verschiedene neue Beobachtungen erweitert. Es ist ihm auch gelungen, α - und β -Casein präparativ voneinander zu trennen, so daß er sie einzeln elektrophoretisch untersuchen konnte. Beide Autoren arbeiteten nur mit Säurecasein. Elektrophoretische Untersuchungen an Labcasein sind unseres Wissens bisher noch nicht veröffentlicht worden. Als erstes Ergebnis unserer Untersuchung, die fortgesetzt wird, hat sich gezeigt, daß Säure- und Labcasein elektrophoretisch deutlich verschieden sind. Wir fanden, daß

bei Natriumlabcaseinatlösungen (p_H 7,3) der α -Gradient auf der Seite der absteigenden Grenzflächen («descending boundaries») nach einiger Zeit in zwei Spitzen aufspaltet, während bei Natriumsäurecaseinatlösungen diese Aufspaltung nicht eintrat. Bei den ersten Versuchen verglichen wir Säure- und Labcaseine, die unabhängig voneinander hergestellt worden waren¹. Um ganz sicherzustellen, daß die Unterschiede im elektrophoretischen Verhalten wirklich nur auf die Labwirkung und nicht etwa auf Differenzen bei der verwendeten Milch oder auf andere zufällig verschiedene Einflüsse bei der Präparation der Caseine zurückzuführen sind, gingen wir noch folgendermaßen vor:

Unter Verwendung von Veronalnatrium-Salzsäure-Puffer und etwas zusätzlicher Natronlauge wurde eine 6prozentige Säurecaseinatlösung mit p_H 6,6 hergestellt. Die Lösung wurde nun geteilt. Zur einen Hälfte (a) wurde filtrierte Lablösung zugesetzt, die durch Erhitzen inaktiviert worden war, zur anderen Hälfte (b) wurde die gleiche Menge aktiver Lablösung zugefügt². Beide Lösungen wurden dann 30 Minuten lang auf 35° C erwärmt, wobei das Casein mit aktivem Ferment in Labcasein übergeführt wird, ohne daß die Lösung irgendeine sichtbare Veränderung erleidet. Die eingetretene Labung kann aber leicht durch den Kalziumionentest festgestellt werden. Nun wurden die Lösungen während 3mal 24 Stunden bei 2–4° C gegen Veronapuffer vom p_H 7,35 dialysiert. Dabei wird, wie wir festgestellt haben, auch das nichterhitzte Lab inaktiviert, sobald das p_H auf 7 gestiegen ist. Nach der Dialyse wurde mit Puffer verdünnt, so daß die Caseinkonzentration noch 1,3% betrug. Das Lösungspaar wurde am gleichen Tag (erst b, dann a) der Elektrophorese unterworfen. Außer allen Konzentrationen waren natürlich auch die übrigen Bedingungen (Spannung, Stromstärke usw.) genau gleich. Die Diagramme wurden mit einer von der Firma Strübin & Co., Basel, gebauten Apparatur aufgenommen (Abbildungsverfahren nach PHILPOT-SVENSSON). Die Apparatur wurde von E. WIEDEMANN³ beschrieben.

In der beigegebenen Abbildung sind die Elektrophoresediagramme der beiden Caseinlösungen einander gegenübergestellt.

Im linken Teil der Bilder (absteigende Grenzflächen) erscheinen Säure- und Labcasein praktisch gleich; wir konnten jedenfalls weder bei der Wanderungsgeschwindigkeit noch beim Flächenverhältnis Unterschiede finden, die reproduzierbar außerhalb von der von uns bisher erreichten Fehlergrenze liegen, weitere Messungen vorbehalten. Dagegen erkennt man auf einen Blick den großen Unterschied bei den aufsteigenden Gradienten, nämlich die Aufspaltung beim α -Casein. Wenn auch eine Auswertung der aufsteigenden Gradienten, solange die Puffergradienten nicht eliminiert sind (was hier nicht der Fall ist), nur mit Vorbehalt vorgenommen werden kann⁴, so läßt sich doch immerhin feststellen, daß das Mengenverhältnis von α_1 zu α_2 beim Labcasein etwa 0,9:1 beträgt. Die elektrophoretische Beweglichkeit von

¹ Die Präparation wurde von H. GERBER⁵ beschrieben.

² Das verwendete Lab war Marke «Rubaco» (1:100 000) der Firma Rud. Baumgartner in Bern. Die zugesetzte Menge betrug 5 mg trockenes Labpulver pro Gramm Casein. Da der Proteingehalt dieses Labpräparates weniger als 4% beträgt, machte er in der Mischung höchstens 0,02% vom Casein aus und konnte somit im Elektrophoresediagramm selbst nicht in Erscheinung treten. Es wurde auch festgestellt, daß es mindestens über dem isoelektrischen Punkt des Caseins keine proteolytische Wirkung hat.

³ E. WIEDEMANN, Schweiz. med. Wschr. 76, 241 (1946).

⁴ E. WIEDEMANN, Helv. chim. acta 30, 168 (1947).

⁵ H. GERBER, Untersuchungen über Lab- und Säurecasein. Diss. Bern (1945).

¹ O. MELLANDER, Bioch. Z. 300, 240 (1939); Nature 155, 604 (1945).

² R. C. WARNER, J. Amer. chem. Soc. 66, 1725 (1944).