

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 Inangahaltung 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 Veronalpuffer 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» (1:100000) 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).

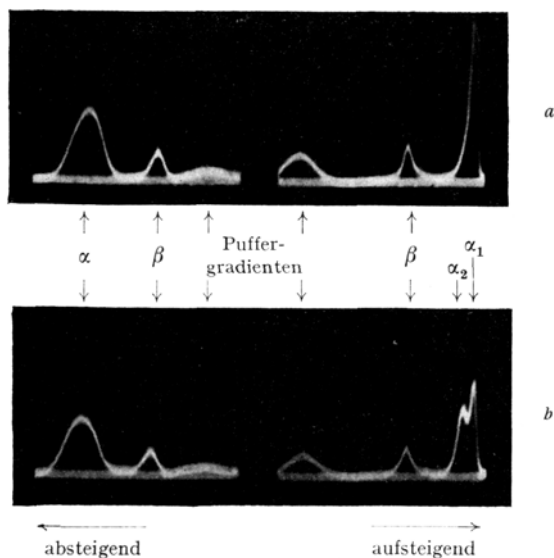
α_1 -Labcasein liegt etwas höher, diejenige von α_2 -Labcasein etwas tiefer als die des einheitlich erscheinenden α -Säurecaseins. Die Werte sind:

Säurecasein α : $9,30 \cdot 10^{-5}$

Labcasein α_1 : $9,55 \cdot 10^{-5}$

Labcasein α_2 : $8,83 \cdot 10^{-5}$.

Der elektrophoretische Vergleich der beiden Caseine wurde einige Male mit frischen Lösungen wiederholt und jedesmal zeigte nur das gelabte Casein diese Aufspaltung des aufsteigenden α -Gradienten. In einem Falle hatten



Elektrophoresediagramme von: a Säurecasein, b Labcasein.

1,3 % in Veronalnatrium-Natriumazetat-Salzsäure-Puffer, p_H 7,35, Ionenstärke 0,077, Spannung 4,45 V/cm, Temperatur 20°C, Aufnahmen nach 8100 Sek.

wir das Lab nur genau eine Viertelstunde bei 35°C einwirken lassen, indem wir die Enzymwirkung nach dieser Zeit durch Alkalizugabe momentan unterbanden (p_H -Steigerung von 6,7 auf 7,4). Dazu benützten wir Puffer, in dem etwas festes Natriumhydroxyd gelöst worden war. Wir verzichteten auf die übliche Dialyse; die Elektrophorese wurde vielmehr sofort vorgenommen, um eventuell nicht inaktivierten Begleitfermenten des Labs möglichst wenig Zeit zur Wirkung zu lassen. Die viertelstündige Behandlung mit Lab genügt aber voll- und aus, um aus dem Säurecasein ein in bezug auf den Kalziumionentest vollwertiges Labcasein zu machen. Tatsächlich fanden wir auch in diesem Falle den Effekt voll ausgebildet, und das Mengenverhältnis α_1 zu α_2 war annähernd dasselbe wie beim zuvor beschriebenen Versuch.

Auch in Phosphatpuffer vom selben p_H konnten wir die Aufspaltung des α -Gradienten beobachten, wenn auch die Separierung von α_1 und α_2 hier weniger gut ist.

Von dem Versuche einer Deutung des beobachteten Effektes sehen wir ab; zuvor muß die Untersuchung weitergetrieben werden. Nur auf eines möge hingewiesen werden. Es will nach Obigem plausibel erscheinen, daß sich die eigentliche enzymatische Reaktion bei der Labung am α -Casein abspielt. Es könnte jedoch auch anders sein. Hier muß darauf hingewiesen werden, daß WARNER (l. c.) unter gewissen Bedingungen bei Säurecasein eine Aufspaltung des aufsteigenden α -Gradienten beobachtet hat, aber nur in Veronalpuffer und bei Caseinkonzentrationen von nicht über 1%. Allerdings ist

aus seinen Aufnahmen zu entnehmen, daß das Mengenverhältnis α_1 zu α_2 viel größer war (rund 4). Es ergibt sich aber hieraus auf alle Fälle, daß schon im Säure- α -casein die Tendenz zur Aufspaltung in zwei Fraktionen vorhanden ist, und daß das Lab diese Aufspaltung vielleicht nur begünstigt. Dabei ist auch die Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, daß das Lab nicht direkt auf das α -Casein, sondern auf irgendeine andere, mengenmäßig vielleicht sehr unbedeutende Caseinfraktion einwirkt, die nachher ihrerseits wieder die Assoziationsverhältnisse zwischen α_1 und α_2 beeinflußt¹.

Wir danken der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der bernischen Hochschule, die einer Gruppe von Dozenten die Anschaffung der Elektrophoreseapparatur ermöglicht hat, sowie Herrn Prof. Dr. A. VON MURALT, Direktor des Berner Physiologischen Instituts, bei welchem die Elektrophoreseapparatur aufgestellt ist, für gewährte Unterstützung bei unserer Arbeit.

HS. NITSCHMANN und W. LEHMANN

Institut für organische Chemie der Universität Bern, den 6. März 1947.

Summary

The electrophoretic patterns of normal casein (precipitated with acid from cow's milk) and of rennet-casein obtained in a veronal buffer at a p_H of 7.3 are remarkably different from each other. The ascending boundary of the α -fraction of casein treated with rennet splits off into two peaks showing the presence of two subfractions (α_1 and α_2). The proportion of quantity of the faster (α_1) and of the slower (α_2) subfraction was found to be about 0.9:1. The α -component of casein which was not treated with active rennet behaved under the same conditions electrophoretically uniform.

¹ Daß das Casein neben α und β weitere kleine, elektrophoretisch differenzierte Fraktionen enthält, hat WARNER gezeigt und konnte von uns im wesentlichen bestätigt werden.

The Influence of Salts on the Inhibition of the Respiration of Baker's Yeast by Basic Dyes

In a preceding paper¹ we have stated that the respiration of baker's yeast in a glucose-phosphate medium is inhibited by three types of basic dyes: the acridine compounds (f. i. tryptaflavine), the thiazines (f. i. methylene blue), the triphenylmethane compounds (f. i. crystal violet) and that this inhibition is at least partially reversed by nucleic acid, adenylic acid and adenosin triphosphoric acid. We have found now that different salts offer a very good protection against the inhibitory activity of basic dyes on the respiration of baker's yeast. It is well understood that this protection is not due to a salting out of the dyes. In this preliminary communication we shall limit our observations to experiments with $MgCl_2$. The observed effects vary somewhat with the strength of respiration of the yeasts. The related results were obtained with strongly respiring baker's yeasts of the Belgian firms "Lion d'Or-Alost" and "Levure Royale-Bruges".

Inhibition by tryptaflavine: At 28°C in phosphate buffer p_H 5.9 and in the presence of glucose (1%), tryptaflavine $5 \cdot 10^{-4}M$ (when one admits that tryptaflavine is pure 3.6 diamino 10 methylacridinium, see

¹ L. MASSART, G. PEETERS, J. DE LEY and R. VERCAUTEREN *Exper.* 3, 119 (1947).