

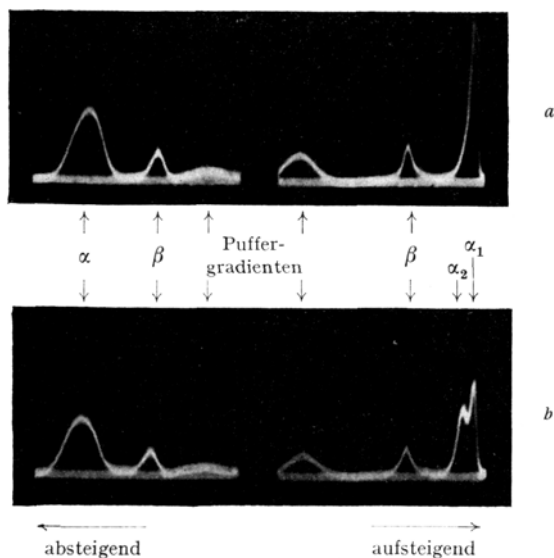
α_1 -Labcasein liegt etwas höher, diejenige von α_2 -Labcasein etwas tiefer als die des einheitlich erscheinenden α -Säurecaseins. Die Werte sind:

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- auf, 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).

however ¹ and ²) causes an inhibition of about 40 to 60 % depending on the yeast examined. This inhibition disappears at least up to 50 % in the presence of MgCl_2 10^{-2}M . We give here some examples of our results on different samples of baker's yeast.

mm ³ O ₂ per hour		
Without Trypaflavine	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$	Trypaflavine $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$, MgCl_2 10^{-2}M
264	152	270
250	164	246

MgCl_2 alone has no influence on the respiration of baker's yeast. The inhibition by other acridines such as 5-aminoacridine and 1-methyl-5-aminoacridine is also reversed by MgCl_2 .

Inhibition by methylene blue and crystal violet: Under the same conditions as for trypaflavine, MgCl_2 offers also a protection against the inhibitory activity of methylene blue and crystal violet. It is however important to state that the protection against crystal violet is not so effective as for methylene blue and trypaflavine.

So far, we were not able to prove that salts offer also a protection against the bacteriostatic action of basic dyes. All the experiments stated above concern only the inhibition of respiration, which occurs at concentrations higher than those necessary to stop growth of yeast.

We have observed that the same facts apply when alcohol is used as substrate instead of glucose, and that once the inhibition is established it is not reversed by MgCl_2 .

We have proved also that there is a correlation between this protective action and the fact that living yeast cells are notably less colored by trypaflavine in the presence of salts than in their absence.

A systematic investigation on the role of salts is run at this moment and full details will be published elsewhere.

This research was aided by a grant of the Ella Sachs Plotz Foundation.

L. MASSART, G. PEETERS, J. DE LEY,
and R. VERCAUTEREN

Biochemical Laboratory and Pharmacological Laboratory of the Veterinary College, University of Ghent, March 11, 1947.

Résumé

MgCl_2 et d'autres sels à des concentrations définies protègent la respiration de la levure de boulangerie contre l'action inhibitrice de colorants basiques.

¹ GAILLOT, Quart. J. Pharmacy and Pharmacology 7, 63 (1934).

² H. BERRY, Quart. J. Pharmacy and Pharmacology 14, 143 (1941).

On the Existence of Intermediate Compounds between Hemoglobin (wholly ferrous) and Methemoglobin (wholly ferric)

In 1942 DARLING and ROUGHTON¹ in order to explain the shift to the left and the change of the shape of the oxygen dissociation curves in mixtures of methemo-

¹ R. C. DARLING and F. J. W. ROUGHTON, Amer. J. Physiol. 137, 56 (1942).

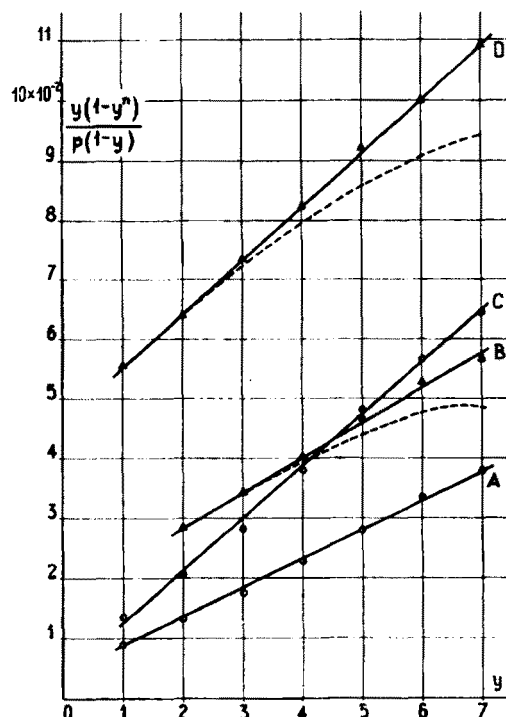
globin and ordinary hemoglobin, proposed the interesting hypothesis of the existence of intermediate compounds between hemoglobin (wholly ferrous) and methemoglobin (wholly ferric). These compounds should contain ferrous and ferric iron atoms in the same molecule. If this hypothesis is correct, the n number of ferrous atoms which are able to bind oxygen in a reversible way at varying oxygen pressures, should decrease from 4 per molecule to lower values, and the new value of n should appear from a mathematical evaluation of the experimental data by means of the stoichiometric equation which has recently been proposed by one of the writers¹. We have submitted to this control the data from the figures 1 and 2 of DARLING and ROUGHTON's work (page 59).

We remind that the stoichiometric equation, which determines the n number of intermediate stages of the reaction of a protein P with a substance A, is the following

$$\frac{y(1-y^n)}{p(1-y)} = \frac{1}{c p_m} + \frac{c-1}{c p_m} y$$

where y is the degree of saturation of P with A (from zero to unity); p is the active concentration of A (in the present case the oxygen pressure is used, being a proportional magnitude) and c and p_m are constants whose meanings will be found in the original article.

The following tracings are reproduced in figure 1, worked out, as already explained, on the data of DARLING and ROUGHTON; A, for $n = 4$ from the oxygen dissociation curve of an ox hemoglobin solution in the



absence of methemoglobin; B, for $n = 4$ (continuous line) and $n = 3$ (dotted line) of the same solution in the presence of methemoglobin amounting to 60 % of the total pigment; C, for $n = 4$ of a human hemoglobin solution; D, for $n = 4$ (continuous line) and $n = 3$ (dotted line) of the same solution in the presence of methemoglobin amounting to 54 % of the total pigment.

¹ E. BOERI, Enzymol. 12, nr 2 (1947).