

## Nachweis der Paraffinbehandlung von Rosinen in Backwaren

A. Rotsch, Detmold

Die bis 30. 6. 1963 befristet zugelassene Paraffinbehandlung von Rosinen ist nach ihrer Verarbeitung zu Backwaren nur dann noch sicher erkennbar, wenn die Paraffinmenge annähernd die zulässige Höchstgrenze (6 g Paraffin auf 1 kg

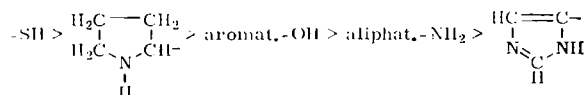
Rosinen) erreicht. Dabei ist die Wanderung des Paraffinöles in die Gebäckkrume zu berücksichtigen. Analytisch wird das Paraffin zweckmäßig im Unverseifbaren des Petrolätherauszuges unter Heranziehung des Kieselgelsäulen-Verfahrens nach Krummel bestimmt. Die große Zunahme des Feuchtigkeitsgehaltes der Rosinen beim Backprozeß macht eine Umrechnung auf Rosinentrockensubstanz erforderlich.

[VB 715]

## Mechanismen enzymatischer Reaktionen

Unter diesem Thema fand am 26. und 27. April 1963 das 14. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie statt [1]. Drei Hauptthemen wurden behandelt: Proteinstruktur und Katalyse, Coenzyme und Wasserstoff-Übertragung.

Über die „Chemische Reaktivität von Proteinen“ gaben K. Wallenfels und C. Streffer (Freiburg/Br.) einen Überblick. Abgesehen von wenigen Ausnahmen sind wahrscheinlich alle Enzymkatalysen Variationen der Säure-Basen-Katalyse oder stehen mit dieser in Zusammenhang. Die Zuordnung von pK-Werten zu bestimmten funktionellen Gruppen eines Proteins ist dann besonders schwierig, wenn die funktionellen Gruppen pK-Werte besitzen, die relativ dicht beieinander liegen oder wenn die Gruppen räumlich benachbart sind wie im Falle der Amino- und der Thiolgruppe des Cysteins, so daß Wechselbeziehungen zwischen ihnen auftreten können. Die Untersuchung der nucleophilen Reaktivität der funktionellen Gruppen von Aminosäuren ergab für die Reaktion mit 2,4-Dinitrofluorbenzol die Reihenfolge:



Eingehend wurde die spezifische Reaktion von SH-Gruppen im Protein behandelt. So ist die Hemmung der enzymatischen Aktivität durch ein als spezifisch angesehenes Reagenz wie p-Chlor-quecksilber(II)-benzoat nicht unbedingt auf eine Reaktion mit einer SH-Gruppe zurückzuführen, da auch Disulfid- oder Aminogruppen reagieren können. In vielen Fällen wirken sogenannte spezifische Reagentien auf die Kettenkonformation des Proteins ein und heben die für die Enzymkatalyse erforderlichen Eigenschaften teilweise oder sogar vollständig auf. Bei der Reaktion zwischen 2,4-Dinitrofluorbenzol und Cystein oder Homocystein wandert nach der Reaktion der SH-Gruppe der Dinitrophenylrest von der SH- zur NH<sub>2</sub>-Gruppe. Ist dagegen die SH-Gruppe von der NH<sub>2</sub>-Gruppe durch mehr als drei Methylgruppen getrennt, tritt diese Umlagerung nicht ein. Auch die Dissoziationsenthalpien zeigten eine Wechselbeziehung zwischen SH- und NH<sub>2</sub>-Gruppe im Cystein an. Nach der Dissoziation des ersten Protons ist das zweite offenbar beiden Gruppen (SH- und NH<sub>2</sub>-) gleich zugeordnet. Die Dissoziation der aus Sulfhydryl- und Aminogruppe im Cystein und Homocystein kombinierten Funktion folgt eigenen Gesetzen.

M. L. Bender (Evanston, Illinois/USA) sprach über das Chymotrypsin, das zu den Serin-Proteinasen gehört. Die durch dieses Enzym katalysierte normale Hydrolyse verläuft sehr wahrscheinlich über eine Acyl-Enzym-Verbindung, einen Ester, der sich spektrophotometrisch nachweisen läßt. Die Hydroxylaminolyse oder die Hydrolyse von Hydroxamsäuren kann dagegen nicht allein so erklärt werden, da das Hydroxylamin, wie Modelluntersuchungen zeigten, ein stärkeres nucleophiles Agens ist als die OH-Gruppe des Serins oder die Imidazolgruppe, Gruppen, deren Lokalisation im aktiven Bereich des Chymotrypsins (und auch der anderen

Serin-Proteinasen) und deren direkte Beteiligung an der Katalyse postuliert wird. Dies wurde abgeleitet aus der pH-Abhängigkeit der Reaktion, dem Isotopeneffekt sowie dem Einfluß der Photooxydation. An der Acylierung des Enzyms sind Gruppen mit pK-Werten von 7 (Imidazol, basische Form) und 8,5 (möglicherweise eine OH-Serylgruppe, saure Form) beteiligt, an der Deacylierung der Acyl-Enzym-Verbindung dagegen nur Imidazol in der basischen Form. Es wird angenommen, daß die Gruppe mit einem pK-Wert von 8,5 die richtige Anordnung von Substrat und OH-Gruppe, die die Esterbindung eingeht, gewährleistet, während die Imidazolgruppe als Säure-Base-Katalysator fungiert.

H. Fasold, U. Gröschl-Stewart, G. Gundlach und F. Turba (Würzburg) befaßten sich mit den Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung bei Hydrolasen. Im Gegensatz zur Ribonuclease reagieren die beiden Histidin-Reste des Chymotrypsins nicht mit Jodessigsäure oder Jodacetamid. Um den Halogenacyl-Rest so spezifisch wie möglich an das aktive Zentrum heranzubringen, wurde die Hemmwirkung von Halogenacyl-aminosäureestern typischer Substrate oder substrat-analoger Inhibitoren auf Chymotrypsin untersucht. Die Aminosäure-Analyse ergab, daß die Histidin-Reste unverändert waren, Methionin aber mit der Halogenverbindung reagierte hatte. Daraus wurde gefolgert, daß Methionin in der räumlichen Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert ist. Aus der Gruppe der Cysteinferrnente (Sulfhydryl-Carboxyl-Typus im Gegensatz zum Imidazol-Hydroxyl-Carboxyl-Typus der Serin-Histidin-Enzyme wie Chymotrypsin) wurde die zeitliche Abhängigkeit der Hemmung der ATPase durch <sup>14</sup>C-N-Äthylmaleinimid verfolgt. Zuerst geht der äthylendiamintetraacetat-empfindliche Teil der Enzymwirkung (Bindungszentrum) verloren, während die Ca-aktivierbare Wirkung (katalytisches Zentrum) wesentlich langsamer abfällt. Dem Bindungszentrum läßt sich im Fingerprint-Diagramm ein Cysteinpeptid zuordnen. Bei Modellversuchen über die Wirkung der Cystein- und Serin-Histidin-Enzyme lieferte z. B. die Messung der Hydrolysegeschwindigkeit von Nitrophenylacetat unter dem Einfluß von Histidin-Verbindungen Hinweise auf die Beteiligung einer dem Imidazolring benachbarten Amidgruppe, die möglicherweise noch durch eine freie Carboxylgruppe wie im Carbobenzoyl-glycyl-m-aminobenzoyl-glycyl-histidinamid beeinflusst wird.

B. R. Rabin und A. P. Mathias (London) konnten zeigen, daß an der Hemmung der Ribonuclease durch Jodessigsäure ein Säurepaar beteiligt ist. Die eine der beiden Säuren muß in ihrer basischen Form (pK 4,85), die andere in ihrer sauren Form (pK 5,55) vorliegen. Die Reaktion des Enzyms mit dem Substrat ist ebenfalls an ein Säurepaar gekoppelt. Die als Säure fungierende Gruppe besitzt im freien Enzym einen pK-Wert von 5,22 und im Enzym-Substrat-Komplex einen von 6,30, für die als Base beteiligte Gruppe liegen die pK-Werte bei 6,78 und 8,10. Daraus und aus dem Einfluß organischer Lösungsmittel auf die Reaktion sowie aus der Alkoholyse wird gefolgert, daß im aktiven Zentrum ein Imidazol-Paar (wahrscheinlich das der Histidinreste 12 und 119) als Säure-Basen-Katalysator lokalisiert ist. Die in der basischen Form erforderliche Imidazolgruppe dient als Acceptor für das Proton des angreifenden nucleophilen Agens (Wasser, Alkohol), während die zweite Imidazolgruppe als Wasserstoffdonator

[1] Die Vorträge werden zusammen mit den Diskussionsbeiträgen im Springer-Verlag erscheinen.