

In Fortsetzung dieser Versuche unternahmen wir es nunmehr, die Hemmung der Eiweißspaltung durch Papain durch verschiedene substituierte Chinone zu messen. Papain diente uns hierbei als *Modellferment* für eine Anzahl in Bakterien nachgewiesener Fermente papain-artiger Natur. Zur Bestimmung der Papainaktivität folgten wir der klassischen Methode von WILLSTÄTTER und GRASSMANN¹; die bei optimaler Temperatur (40° C) und optimalem p_H (5,0) stattfindende Eiweißspaltung wird durch Bestimmung des Zuwachses an $-COOH$ -Gruppen mittels Titration mit alkoholischer KOH in alkoholischer Lösung unter Verwendung von Thymolphthalein als Indikator gemessen. Als Substrat wurde reinste Gelatine, als Enzympräparat das käufliche Papayotin (SCHUCHARDT) verwendet. Die Inhibitoren wurden sämtlich in Wasser gelöst der Versuchslösung zugesetzt. Ein Blindversuch unter gleichen Bedingungen, aber ohne Zusatz eines Inhibitors, diente als Maß zur Bestimmung der prozentuellen Hemmung der Papainaktivität. Es wurden auch Versuche unter Zusatz von HCN zur Ausschaltung der «Antikatalyse» durch Schwermetalle durchgeführt; diese ergaben innerhalb der Versuchsfehlergrenze die gleichen Hemmungswerte.

Die in der Tabelle angegebenen Hemmungswerte sind in allen Fällen Hemmungswerte aus bei vier verschiedenen Zeiten (2, 4, 7 und 24 Stunden) ausgeführten Messungen. Die Werte sind mit einer Fehlergrenze von $\pm 5\%$ auch bei Verwendung verschiedener Gelatinesorten reproduzierbar; diese Genauigkeit reicht für den von uns angestrebten Zweck völlig aus.

Tabelle 1

Hemmung der Aktivität nicht aktivierte Papains durch Chinone

Substanz	Prozentuelle Hemmung der Eiweißspaltung bei verschiedener molarer Konzentration der Hemmstoffe im Versuchsansatz		
	10^{-4}	10^{-5}	gesättigte Lösung
p-Benzochinon	100	32	
Toluchinon	71	25	
p-Xylochinon	42	29	
4-Methoxytoluchinon . . .	18	4	
2,6-Dimethoxybenzochinon	0	—	
2,5-Dimethoxybenzochinon	unlös.	0	
Chlorbenzochinon	0	—	
2,6-Dichlorbenzochinon . .	unlös.	40	
2,5-Dichlorbenzochinon . .	unlös.	29	
Trichlormethylbenzochinon	unlös.	unlös.	31 (Konz. ca. 10^{-6})
Chloranil	unlös.	unlös.	0 (Konz. ca. 10^{-7})
1,2-Naphthochinon	unlös.	48	
1,4-Naphthochinon	unlös.	5	
Lawson	unlös.	0	
Isonaphthazarin	unlös.	0	

Außer den angeführten Chinonen haben wir noch versucht, die Hemmwirkung von Naphthazarin und Methyl-naphthazarin auf die Papainaktivität zu bestimmen; diese Substanzen erleiden aber bei der Titration einen Farbwechsel, der die Erkennung des Umschlags des Thymolphthaleins stark stört; die erhaltenen Ergebnisse bedürfen der Verifizierung durch eine andere Methodik. Von Antibiotics anderer Gruppen wurden Penicillin, Patulin und Salizylsäure geprüft; keine dieser

¹ R. WILLSTÄTTER und W. GRASSMANN, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 138, 184 (1924).

Substanzen zeigt in den bei Chinonen noch wirksamen Konzentrationen irgendeinen Einfluß auf die Papainaktivität.

Bei Vergleich obiger Tabelle mit den Wirkungsreihen derselben Chinone gegenüber Bakterienkulturen läßt sich kaum irgendeine Übereinstimmung feststellen. Daraus können wir mit einiger Wahrscheinlichkeit schließen, daß die Hemmung von Papain ebensowenig wie die der früher untersuchten Fermente Urease und Katalase in einem Zusammenhang mit der Wachstums-hemmung der Bakterien steht. Die Frage ist aber weiterhin offen und wird von uns in laufenden Versuchen geprüft.

Eine interessante Beobachtung ist, daß die Wirkungsreihe der verschiedenen Chinone gegenüber der Papainaktivität weitgehend den von uns früher erhaltenen Wirkungsreihen derselben Substanzen gegenüber Urease bzw. Katalase entspricht. Es kann daraus vermutet werden, daß der Wirkmechanismus der Hemmung bei diesen drei Fermenten ein ähnlicher ist, was bei Urease und Papain nicht überraschend erscheint, da ja die meisten Aktivatoren und Hemmkörper bei diesen beiden Enzymen parallele Wirkungen entfalten. Derartige Ähnlichkeiten sind aber für die Katalase noch nicht festgestellt worden.

Beiläufig sei noch bemerkt, daß die Hemmwirkungen der Chinone gegenüber diesen drei Fermenten keine Übereinstimmung mit den Oxydations-Reduktionspotentialen derselben Chinone aufweisen; trotzdem kann aber eine oxydative Wirkung der Grund für die Hemmwirkung sein; denn, wie kürzlich im hiesigen Laboratorium festgestellt wurde¹, geht selbst die Oxydation des Hämoglobins zum Methämoglobin durch dieselben Chinonderivate nicht entsprechend dem Oxydations-Reduktionspotential der einzelnen Substanzen vor sich, wobei in diesem Falle ein Zweifel am Oxydationscharakter der Reaktion doch kaum möglich ist.

OTTO HOFFMANN-OSTENHOF und ELISABETH BIACH

I. chemisches Laboratorium der Universität Wien, den 15. Juni 1946.

Summary

With the intention to clarify the mechanism of action of the antibiotic effect of some quinones the inhibition of the activity of papain by various quinones was measured. The results let it appear improbable that there is any relation between the antibacterial effect of the quinones and their inhibition power on papain. On the other hand a close parallelism was found in the strength of inhibition of the same quinones on papain, urease and catalase. The mechanism of action of the quinone inhibition of these three enzymes must be regarded as a very similar one.

¹ O. HOFFMANN-OSTENHOF, W. WEIS und O. KRAUPP, Mh. Chem. (im Druck).

Über die Entstehung von Dehydracetsäure und ihren Analogen bei der Oxydation der $\alpha, \gamma, \delta, \zeta$ -Tetraketone mit Bleitetraacetat

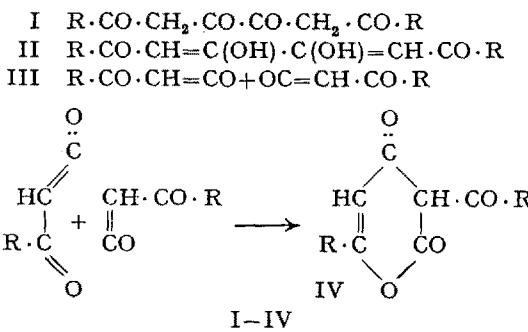
Bei den Versuchen, die $\alpha, \gamma, \delta, \zeta$ -Tetraketone I mit Bleitetraacetat in Eisessig zu oxydieren, entstanden unerwartet in guten Ausbeuten die Dehydracetsäure bzw. analoge «Dehydro»- β -ketosäuren (IV). So wurde aus Oxalyl-diäaceton (Ia) die Dehydracetsäure (IVa), aus Dekantetron-(3, 5, 6, 8) (Ib) die Dehydro-propionyl-

essigsäure (IVb) und aus Oxalyl-diacetophenon (Ic) die Dehydro-benzoyl-essigsäure (IVc) erhalten.

Man kann die ungewöhnlich verlaufende Reaktion durch die Annahme erklären, daß die $\alpha, \gamma, \delta, \zeta$ -Tetra-ketone in der Di-enol-Form (II) reagieren, welche eine Glykolspaltung unter Bildung von Acyl-keten (III) erleidet. Aus 2 Molekülen Acyl-keten entsteht dann die «Dehydro»- β -ketosäure.

Schon L. CLAISEN¹ hat angenommen, daß die «Dehydro»- β -ketosäuren bei der klassischen Bildungsweise durch Pyrolyse von β -Ketoestern ihre Entstehung einer Dimerisierung der intermediär auftretenden unbeständigen Acyl-ketene verdanken.

Einen ähnlichen Reaktionsmechanismus zogen H. STAUDINGER und H. BECKER² in Erwägung zur Erklärung der Bildung der analog gebauten Verbindung IVd aus Malon-monomethylester-säurechlorid bei der Behandlung mit Chinolin.



a R = CH₃ b R = C₂H₅ c R = C₆H₅ d R = OCH₃

Die beobachtete Reaktion bestätigt diese Vermutung und erlaubt darüber hinaus die «Dehydro»- β -ketosäuren IV auf einfache Weise unter milden Reaktionsbedingungen herzustellen.

K. BALENOVIĆ

Chemisches Institut, Universität Zagreb (Jugoslawien),
den 26. August 1946.

Summary

Oxidation of $\alpha, \gamma, \delta, \zeta$ -Tetra-ketones (I) with lead-tetraacetate yields dehydracetic acid and analogous compounds (IV). The reaction can be understood if one assumes that acylketenes (III) are formed as intermediates through the glycol-fission of the dienolic form II of the tetra-ketones.

¹ In einer Privatmitteilung an H. STAUDINGER und H. BECKER (vgl. Anm. 2).

² Ber. dtsch. chem. Ges. 50, 1016 (1917).

nische Chemie (Prof. PL. A. PLATTNER) der ETH. durchgeführten Untersuchung erzielt wurden. Die mit Molke erhaltenen wesentlichen Resultate sind bereits in Patenten niedergelegt¹, aber inzwischen durch Verwendung produktiver Penicillien weit übertroffen.

Ähnlich wie F. BÄR, standen wir bei der damaligen Zuckerknappheit vor dem Problem, für Oberflächenkulturen von Penicillien eine geeignete Kohlehydratbasis zu finden. Besonders aber mußte eine «Wuchsstoff»quelle erschlossen werden, da ohne eine solche auf Czapek-Dox-Nährösung mit 4% Rohrzucker in kürzerer Zeit bekanntlich kaum Penicillin, höchstens Notatin gebildet wird. Wir fanden nun eine Zucker- und zugleich Wuchsstoffquelle in der Molke bzw. in der durch Abscheidung des Molkeneiweißes daraus entstehenden Schotte. Da diese beiden Milchprodukte ca. 4,8% Laktose enthalten, konnten sie noch mit $\frac{1}{2}$ bis maximal 1/1 ihres Volumens an destilliertem Wasser verdünnt werden. Überraschend war dann der Befund, daß ihre Wuchsstoffeigenschaften besonders hervortreten bei Zusatz von anorganischen Salzen nach Czapek-Dox. Die folgende Tabelle gibt einen typischen, sehr oft reproduzierten Versuch wieder. Danach wurden bei genügender Schottenkonzentration und Salzzugabe (a und c) in 9–13 Tagen Kulturfiltrate gewonnen, die im Verdünnungstest an *Staphylococcus aureus* eine etwa 20fach stärkere antibakterielle Wirkung ausübten als entsprechende Filtrate aus Kulturen auf Czapek-Dox-Salzlösung mit Zucker (f).

	Nährösung				Kulturfiltrat	
	% Schotte	% dest. H ₂ O	% Salzgemisch ²	% Rohrzucker	pH	Einheiten ³ pro cm ³
a	99,5	—	0,5	—	7,4	52
b	100	—	—	—	5,8	12
c	75	24,5	0,5	—	7,4	52
d	50	49,5	0,5	—	7,4	40
e	25	74,5	0,5	—	7,2	10
f	—	97,5	0,5	2	5,6	3

Im allgemeinen wurde frische Molke mit Milchsäure auf pH 4,5 eingestellt, mit dem Salzgemisch versetzt und innert 2 Stunden auf 90°C erhitzt. Nach Abkühlen und Abtrennen des Molkeneiweißes verdünnte man die Schotte gegebenenfalls mit Wasser und sterilisierte je 150 cm³ oder 800 cm³ davon in Glas- oder Aluminiumgefäß. Angeimpft wurde mit einem zur *Chrysogenum*-gruppe der Gattung *Penicillium* gehörenden Schimmel-pilz⁴. Zur Erzielung eines gleichmäßig und nicht nur am Rande wachsenden Oberflächenmyzels ist es wesentlich, die größeren Gefäße nach 3–4 Tagen zu schütteln. Ähnliche Resultate wurden mit 6% Trockenschotte oder Magermilchpulver in einer wässrigen Salzgemischlösung erhalten. Gelegentlich mußte in den Molkenprodukten ein starker (saisonmäßiger?) Abfall des Wuchsstoffgehaltes festgestellt werden.

¹ Siehe z. B. Schweiz. Pat. Nr. 240315, angemeldet 13. 1. 1944, veröffentlicht 16. 4. 1946; Franz. Pat. Nr. 908774 und viele andere.

² Natriumnitrat 0,3%; Monokaliumphosphat 0,1%; Kaliumchlorid 0,05%; Magnesiumsulfat (7 H₂O) 0,05%; Ferrosulfat (7 H₂O) 0,001%. Vgl. im übrigen den inzwischen von R. P. COOK und W. J. TULLOCH, Nature 155, 515 (1945), beobachteten günstigen Einfluß des Zusatzes großer Salzmengen zu Erbsenpreßsaft.

³ Da uns damals noch kein internat. Penicillin-Standard zur Verfügung stand, ist die absolute Größe dieser Einheit ungewiß. Sie dürfte etwa der internat. Einheit entsprechen.

⁴ Dr. L. ETTLINGER, Zürich.

Molke und andere Naturstoffe als Substrate für Penicillien bei der Penicillinherstellung

F. BÄR berichtet soeben über Versuche, als Substrat für *Penicillium notatum* bei der Penicillinegewinnung Molke zu verwenden¹. Er kommt zum Schluß, daß Molke bei Zusatz von Hefe der üblichen modifizierten Czapek-Dox-Nährösung² mit 4% Zuckerzusatz gleichwertig sei. Dies veranlaßt uns zu einer kurzen Notiz über eigene Ergebnisse, die vor drei Jahren im Rahmen einer in Gemeinschaft mit dem Institut für spezielle Botanik (Dr. L. ETTLINGER) und dem Institut für orga-

¹ F. BÄR, Pharmazie (Berlin), 1, 52 (1946).

² P. W. CLUTTERBUCK, R. LOVELL und H. RAISTRICK, Biochem. J. 26, 1907 (1932).