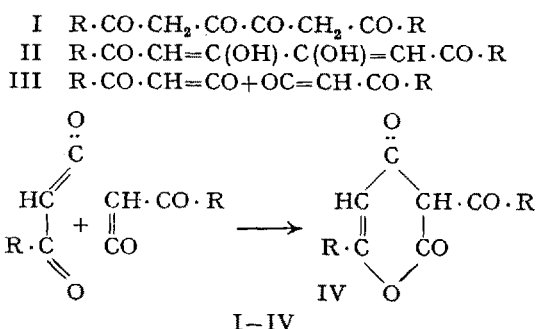


essigsäure (IVb) und aus Oxalyl-diacetophenon (Ic) die Dehydro-benzoyl-essigsäure (IVc) erhalten.

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

Schon L. CLAISEN<sup>1</sup> hat angenommen, daß die «Dehydro»- $\beta$ -ketosäuren bei der klassischen Bildungsweise durch Pyrolyse von  $\beta$ -Ketoestern ihre Entstehung einer Dimerisierung der intermediär auftretenden unbeständigen Acyl-ketene verdanken.

Einen ähnlichen Reaktionsmechanismus zogen H. STAUDINGER und H. BECKER<sup>2</sup> in Erwägung zur Erklärung der Bildung der analog gebauten Verbindung IVd aus Malon-monomethylester-säurechlorid bei der Behandlung mit Chinolin.



a R = CH<sub>3</sub>    b R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>    c R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>    d R = OCH<sub>3</sub>

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

K. BALENOVIĆ

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

#### Summary

Oxidation of  $\alpha, \gamma, \delta, \zeta$ -Tetraketones (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 tetraketones.

<sup>1</sup> In einer Privatmitteilung an H. STAUDINGER und H. BECKER (vgl. Anm. 2).

<sup>2</sup> Ber. deutsch. chem. Ges. 50, 1016 (1917).

### Molke und andere Naturstoffe als Substrate für Penicillien bei der Penicillinherstellung

F. BÄR berichtet soeben über Versuche, als Substrat für *Penicillium notatum* bei der Penicillingewinnung Molke zu verwenden<sup>1</sup>. Er kommt zum Schluß, daß Molke bei Zusatz von Hefe der üblichen modifizierten Czapek-Dox-Nährlösung<sup>2</sup> 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-

nische Chemie (Prof. PL. A. PLATTNER) der ETH. durchgeführten Untersuchung erzielt wurden. Die mit Molke erhaltenen wesentlichen Resultate sind bereits in Patenten niedergelegt<sup>1</sup>, aber inzwischen durch Verwendung produktiverer 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-Nährlösung 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 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).

	Nährlösung				Kulturfiltrat	
	% Schotte	% dest. H <sub>2</sub> O	% Salzgemisch <sup>2</sup>	% Rohrzucker	pH	Einheiten <sup>3</sup> pro cm <sup>3</sup>
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 cm<sup>3</sup> oder 800 cm<sup>3</sup> davon in Glas- oder Aluminiumgefäßen. Angeimpft wurde mit einem zur *Chrysogenum*-gruppe der Gattung *Penicillium* gehörenden Schimmelpilz<sup>4</sup>. 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.

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

<sup>2</sup> Natriumnitrat 0,3%; Monokaliumphosphat 0,1%; Kaliumchlorid 0,05%; Magnesiumsulfat (7 H<sub>2</sub>O) 0,05%; Ferrosulfat (7 H<sub>2</sub>O) 0,001%. Vgl. im übrigen den inzwischen von R. P. Cook und W. J. TULLOCH, Nature 165, 515 (1945), beobachteten günstigen Einfluß des Zusatzes großer Salzmenigen zu Erbsenpreßsaft.

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> Dr. L. ETTLINGER, Zürich.

<sup>1</sup> F. BÄR, Pharmazie (Berlin), 1, 52 (1946).

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

Daß es sich bei dem Antibiotikum der alkalischen Kulturfiltrate um Penicillin handelt, wurde durch Extraktion mit Essigester bei  $p_H$  2 und Aufarbeitung der Extrakte bewiesen.

In diesem Zusammenhang seien schließlich noch einige Naturstoffe aufgeführt, die in unseren dazumaligen Parallelversuchen besonders ausgesprochene «Wuchsstoffeigenschaften» besaßen, im Sinne einer rascheren und wesentlich vermehrten Penicillinbildung bei der Oberflächenkultur. Sie wurden einer 2%igen Rohrzuckerlösung mit *Czapek-Dox*-Salzen und gegebenenfalls Schwermetall- und weiteren anorganischen Salzen zugesetzt. Ihre Wirkung reicht im allgemeinen nicht ganz an diejenige des heute im großen verwendeten «Corn steep liquor» heran. Einige dieser Zusätze sind bereits früher oder inzwischen auch von anderer Seite benutzt worden.

- 1–2% zitronensaures K oder Na<sup>1</sup>
- 0,5–1% Obstkonzentrat (Trauben, Äpfel oder Birnen<sup>1</sup>)
- 3–4% rohe Watte (Extrakt aus –)<sup>2,3</sup>
- 0,3–1% Rübenmelasse
- 6% Rübenmelasse (ohne Zuckerzusatz)
- 1% Rübenschempe (Eindampfrückstand der alkoholisch vergorenen Rübenmelasse)
- 2% Rohrzucker aus Zuckerrohr (ohne Zuckerzusatz)
- 1–2% Weizenkleie oder Weizenkeimlinge (Extrakt aus –)
- 2% Weizenschempe (von der Stärkefabrikation).

A. WETTSTEIN

Forschungslaboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel, den 3. September 1946.

### Summary

Solutions containing 50 and more percent of whey and additional anorganic salts represent suitable substrates for the surface culture of *Penicillia* in the production of penicillin. Some other natural substances are enumerated, which, in our experiments, also enhanced the penicillin yield.

<sup>1</sup> Wie weit hier die Pufferwirkung mitspielt, soll offengelassen werden.

<sup>2</sup> Dr. L. ETTINGER, Zürich.

<sup>3</sup> Vgl. W. H. SCHOPFER und W. RYTZ, Arch. Mikrobiol. 8, 244 (1937).

### Einwirkung von N-Brom-succinimid auf $\Delta^4$ -3-Keto-steroid<sup>1</sup>

In dieser Zeitschrift beschrieb NG. PH. BUU-HOI<sup>2</sup> kürzlich die Umsetzung zweier aliphatischer Ketone, die eine Doppelbindung in Konjugation zur Keto-Gruppe aufweisen, mit N-Brom-succinimid<sup>3</sup>. Er schloß aus seinen Versuchen, daß in beiden Fällen die Methylgruppe in  $\alpha$ -Stellung zur Keto-Gruppe mit Brom substituiert wird, letzteres also nicht wie bei einfachen Äthylenverbindungen<sup>4</sup> an der  $\alpha$ -Stellung zur Doppelbindung (in der sogenannten Allylstellung) angreift. Eine Anzahl wichtigster Hormone der Steroidreihe stellen ebenfalls  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Ketone dar, und wir untersuchten des-

<sup>1</sup> 53. Mitteilung der Reihe «Über Steroide» (52. Mitt. s. Helv. chim. acta 29, 1231 (1946).

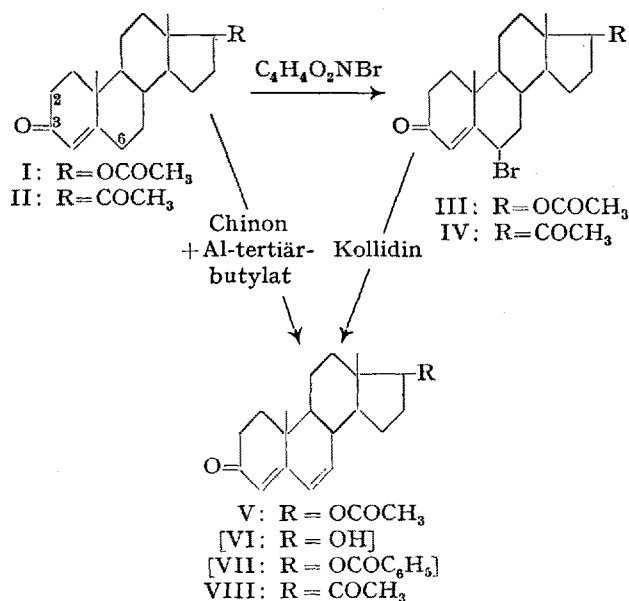
<sup>2</sup> NG. PH. BUU-HOI, Exper. 2, 310 (1946).

<sup>3</sup> Zur analogen Bromierung gesättigter Ketone vgl. H. SCHMID und P. KARRER, Helv. chim. acta 29, 573 (1946).

<sup>4</sup> K. ZIEGLER, A. SPÄTH, E. SCHAAF, W. SCHUMANN und E. WINKELMANN, Liebigs Ann. Chem. 551, 80 (1942). — Vgl. CH. MEYSTRE, H. FREY, A. WETTSTEIN und K. MIESCHER, Helv. chim. acta 27, 1815 (1944).

halb, wie in solchen Fällen die Einwirkung von N-Brom-succinimid verläuft. Würde hier das Brom in  $\alpha$ -Stellung zur 3-Keto-Gruppe eintreten, so ergäbe sich die Möglichkeit, durch anschließende Bromwasserstoffabspaltung in glatter Reaktion zu  $\Delta^4$ -3-Keto-dienen zu gelangen, die wichtige Zwischenprodukte bei der Aromatisierung des Ringes A darstellen<sup>1</sup>.

In den ersten Vorversuchen reagierte Testosteron-azetat (I) mit N-Brom-succinimid in Tetrachlorkohlenstoff unter der von uns früher als besonders vorteilhaft befundenen Belichtung<sup>2</sup> zwar sehr rasch, aber etwas uneinheitlich. Wurde es hingegen auf ähnliche Weise im Dunkeln mit 3 Mol Brom-succinimid erhitzt, so war nach 5 Stunden gerade ungefähr 1 Mol des letzteren verbraucht, und das Reaktionsprodukt ergab durch Kochen mit Kollidin (45 Minuten) und Umkristallisieren in 80%iger Ausbeute ein einheitliches reines Ke-



todien  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_3$ . Dieses erwies sich nach Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und optischer Drehung<sup>3</sup> als identisch mit dem früher (durch Dehydrierung mittels Chinon und Aluminium-tertiär-butylat) direkt aus dem  $\Delta^4$ -3-Keton erhaltenen 6-Dehydro-testosteron-azetat (V)<sup>4</sup>. Die neue, stufenweise Umwandlung über das Bromid verläuft insgesamt mit wesentlich besserer Ausbeute als die direkte Überführung. Die Konstitution der Verbindung V wurde weiter durch Verseifung mit alkoholischer Kalilauge zum 6-Dehydro-testosteron  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_2$  (VI)<sup>4</sup> und durch Benzoylierung des letzteren zum 6-Dehydro-testosteron-benzoat (VII)<sup>4,5</sup> sichergestellt. Auch diese beiden Verbindungen zeigten mit authentischen Präparaten keine Schmelzpunktserniedrigung.

Aus der Natur der erhaltenen Verbindungen V–VII ergibt sich die Tatsache, daß bei der Umsetzung von  $\Delta^4$ -3-Keto-steroiden mit N-Brom-succinimid von den zwei Methylengruppen in 2- bzw. 6-Stellung die letztere stark bevorzugt reagiert. Es tritt hier also die übliche

<sup>1</sup> H. H. INHOFFEN und Mitarb., Ber. 73, 451 (1940); 74, 1911 (1941); Angew. Chem. 53, 471 (1940).

<sup>2</sup> CH. MEYSTRE, L. EHMAN, R. NEHER und K. MIESCHER, Helv. chim. acta 28, 1252 (1945); CH. MEYSTRE und K. MIESCHER, *ibid.* 28, 1497 (1945); 29, 33 (1946); CH. MEYSTRE, H. FREY, R. NEHER, A. WETTSTEIN und K. MIESCHER, *ibid.* 29, 627 (1946).

<sup>3</sup>  $[\alpha]_D^{25} = +35,5^\circ \pm 4^\circ$  (in Äthanol).

<sup>4</sup> A. WETTSTEIN, Helv. chim. acta 23, 388 (1940).

<sup>5</sup> L. RUZICKA und W. BOSSHARD, Helv. chim. acta 20, 328 (1937).