

Ordinate gezogen und die Neigung der Indikatorkurven im Schnittpunkt bestimmt. Diese Neigung liefert uns Werte für das Differential $d(p_H)/dc$, für die Laugenkonzentration c . Da mehrere Kurven übereinanderliegen, erhält man für jede Konzentration einige solcher Werte für das Differential. Von diesen wurde nun ein Mittelwert genommen, indem den verschiedenen Messwerten aber verschiedene Gewichte beigelegt wurden, da die Messgenauigkeit ja stark von der Grösse des Neutralisationsverhältnisses abhängt¹⁾. Wenn man nun die p_H -Werte für $n.NaOH$ und $n.KOH$ je zu 14 annimmt²⁾, so entstehen mit Hilfe dieser Differentiale die p_H -Kurven der Figuren 4 und 5. Diese Kurven geben uns den ersten Anhaltspunkt über die Stärke der Alkalinität der starken kaustischen Laugen. Die konzentrierteste bei 20° noch flüssige Natronlauge hat darnach einen p_H -Wert von etwa 19. Von Laugen derselben Normalität ist die $\{KOH\}$ wesentlich alkalischer als die $\{NaOH\}$. Drücken wir aber die Konzentration in Prozenten aus, so ist die $\{NaOH\}$ eher etwas alkalischer als die Kalilauge. Das ist auch zu erwarten, da der p_H -Wert durch das Verhältnis der Aktivitäten $(OH)/(H_2O)$ bestimmt wird. Von $\{NaOH\}$ und $\{KOH\}$ derselben Normalität enthält die erstere aber mehr Wasser, und von $\{NaOH\}$ und $\{KOH\}$ desselben Prozentsatzes enthält die letztere weniger Hydroxylionen im Liter.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

41. Über den Esterase-Gehalt verschiedener Pneumokokken-Typen

von Peter Bernoulli und Hubert Bloch.

(4. II. 44.)

Über Pneumokokken-Fermente liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor, hingegen wurde speziell der Esterase-Gehalt dieser Mikroorganismen nur in zwei Arbeiten eingehender berücksichtigt: Eine ältere Arbeit von *Avery* und *Cullen*³⁾ zeigt, dass sich in Autolysaten von Pneumokokken des Typs II ein Tributyrin-spaltendes

¹⁾

$\lg \frac{[S]}{[HS]}$	-1 bis -0,8	-0,8 bis -0,6	-0,6 bis -0,4	-0,4 bis -0,2	-0,2 bis +0,2	+0,2 bis +0,4	+0,4 bis +0,6	+0,6 bis +0,8	+0,8 bis +1,0
Gewicht	1	2	3	4	5	4	3	2	1

²⁾ Der mittlere Aktivitätskoeffizient von $n.NaOH$ bzw. $n.KOH$ beträgt bei 20° 0,676 (*G. Akerlöf*, *Am. Soc.* **62**, 620 (1940)) und da der negative Log. des Ionenproduktes von Wasser bei dieser Temperatur 14,17 ist (*Harned* und *Hamer*, *Am. Soc.* **55**, 2198 (1933)), so wird der konventionelle p_H -Wert $p_H = 14,17 + \lg 0,676 = 14,0$. Allerdings ist dieser Wert bei einer so hohen ionalen Stärke noch nicht ganz identisch mit dem p_H -Wert.

³⁾ *O. T. Avery* und *G. E. Cullen*, *J. exptl. Med. (Am.)* **32**, 571 (1920).

Ferment nachweisen lässt. In neuerer Zeit glaubte ferner *Schaller*¹⁾, den experimentellen Beweis dafür erbracht zu haben, dass Pneumokokken des Typs I erhebliche Mengen von Cholin-Esterase (ChE) enthalten. Bei diesen Arbeiten sowohl, als auch bei den Untersuchungen über andere Fermente begnügte man sich jedoch damit, einen einzigen Stamm als Vertreter der ganzen Gruppe, bzw. je einen einzelnen Stamm als Vertreter der verschiedenen Typen von Pneumokokken heranzuziehen und aus den Versuchsergebnissen Schlüsse abzuleiten, die für die ganze Gruppe dieser medizinisch wichtigen Krankheitserreger Gültigkeit haben sollten.

Im Anschluss an diese vorliegenden Ergebnisse haben wir eigene Untersuchungen angestellt, über die wir hier berichten. Wir haben unsern Versuchen folgende Fragen zugrunde gelegt:

1. Bleibt der Esterase-Gehalt ein und desselben Pneumokokken-Stammes über längere Zeit konstant?

2. Lassen sich Pneumokokken verschiedenen Typs auch hinsichtlich ihres Esterase-Gehalts unterscheiden; mit andern Worten: Kann der Esterase-Gehalt mit zur Typencharakterisierung herangezogen werden?

3. Zu welcher Gruppe von Lipasen gehören die von *Avery* und *Cullen* nachgewiesenen Fermente?

4. Lassen sich die Befunde von *Schaller* bestätigen?

Diesen letzten Punkt abzuklären, schien uns ganz besonders wichtig, da unseres Wissens ausser von *Schaller* noch nie ChE in Bakterien gefunden werden konnte, und einem solchen Befund auch im Hinblick auf das Bild, das man sich von der Wirksamkeit dieses Ferments macht, erhöhte Bedeutung zukäme.

Methodik.

1. Bakterienmaterial: Die untersuchten Pneumokokkenstämme wurden alle aus Sputumproben frisch isoliert und in der üblichen Weise serologisch typisiert. Die Weiterzucht der Stämme erfolgte durch Überimpfen auf Blutagarplatten in zweitägigen Intervallen. Alle 2 bis 3 Wochen wurde eine Mauspassage dazwischengeschaltet und die Reinheit des Stamms sowie seine Typenzugehörigkeit kontrolliert.

Zum Versuch wurden jeweils 5—7 dicht bewachsene, 15—16 Stunden alte Blutagarplatten mit wenigen cm³ 0,85-proz. Natriumchlorid-Lösung abgeschwemmt, die so gewonnene Bakteriensuspension bei 3000 U./min. in der Winkelzentrifuge 15 Minuten zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und der Bodensatz mehrmals durch wiederholtes Zentrifugieren gewaschen. Die so von anhaftenden Resten des Kulturmilieus befreiten Bakterien wurden in destilliertem Wasser mässig dicht suspendiert und diese Aufschwemmung in 2 Teile geteilt: Der eine Teil (5 cm³) wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und hernach das Trockengewicht bestimmt, um die ungleich dichten Suspensionen und damit die Versuchsergebnisse vergleichbar zu machen. Den andern Teil mischten wir mit dem gleichen Volumen einer frisch bereiteten 10-proz. Natriumcholatlösung. Dieses Gemisch wurde 3 Stunden bei 37° gehalten, wodurch die ursprünglich trübe Suspension klar wurde: Die Pneumokokken waren autolytisch. Diese Lösung bezeichnen wir als Pneumokokken-Autolysat.

¹⁾ K. Schaller, Z. physiol. Ch. **276**, 271 (1942); daselbst auch Literaturübersicht.

2. Bestimmung der Fermentaktivität: Die Aktivität sämtlicher Esterasen wurde im Warburg-Apparat bestimmt, die Lipasen nach der Methode von Rona und Lasnitzki¹⁾, die ChE nach Ammon²⁾. Die Substratkonzentrationen waren durchwegs die gleichen, wie wir sie bereits früher mehrfach angewendet und ausführlich beschrieben haben³⁾. Als Fermentpräparation diente jeweils Pneumokokken-Autolysat in der Endkonzentration von 1:4 im Warburg-Gefäß. Versuchstemperatur: 37°.

Ergebnisse.

1. Esterasen im engern Sinn und Lipase⁴⁾: Um nichts über die noch unklare Natur dieser Fermente zu präjudizieren, werden wir sie im folgenden nach dem Substrat, das sie hydrolysieren, als Tributyrasen bezeichnen. Im ganzen haben wir 16 verschiedene Pneumokokken-Stämme, die 10 verschiedenen Typen angehören, auf ihren Tributyrasegehalt untersucht. Jeder einzelne Stamm wurde zwischen 10 und 32mal untersucht, um erstens die Fehlerbreite der Methodik kennen zu lernen und zweitens etwas aussagen zu können über die Konstanz des Fermentgehaltes des betreffenden Stammes durch viele Generationen hindurch, sowohl nach Zwischenschaltung zahlreicher Nährboden- als auch Tierpassagen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Tributyrinspaltung durch verschiedene Pneumokokkenstämme. (Die Zahlen bedeuten mm³ CO₂ in 60 Minuten, berechnet auf 1 mg Pneumokokken-Trockensubstanz. Der Spaltungsverlauf ist während dieser Zeit linear.)

Typenzugehörigkeit des Stammes	Mittelwert M	Anzahl Beobachtungen n	Mittlere Abweichung der Einzelbestimmung σ	Mittlerer Fehler ϵ
I	20	14	13,4	3,6
I	206	14	8,9	2,4
II	126	23	16,4	3,4
II	171	10	19,6	6,2
III	142	26	36,4	7,1
III	28	24	14,4	2,9
III	106	26	36,0	7,0
III	133	20	18,7	4,2
III	151	21	21,9	4,8
IV	242	15	30,9	7,8
X	119	16	12,0	3,0
XI	172	14	23,1	6,1
XV	141	10	19,1	6,0
XVI	163	11	19,5	5,9
XXVI	323	13	28,4	7,9
XXX	225	32	61,5	10,8

Aus dieser Tabelle ist folgendes ersichtlich:

1. Die Genauigkeit der Methode ist befriedigend. In der Grosszahl der Fälle liegt der mittlere Fehler der Bestimmung unterhalb $\pm 5\%$.

¹⁾ P. Rona und A. Lasnitzki, Bioch. Z. **152**, 504 (1924).

²⁾ R. Ammon, Pflüger's Archiv **233**, 486 (1933).

³⁾ H. Bloch, Helv. **25**, 793 (1942); A. Hottinger und H. Bloch, Helv. **26**, 142 (1943).

⁴⁾ Betr. Nomenklatur s. R. Ammon, in Nord-Weidenhagen, Handb. d. Enzymologie I, 382. Leipzig 1940.

2. Die Tributyrasewerte der untersuchten Pneumokokken weisen von einem Stamm zum andern beträchtliche Unterschiede auf, die um mehr als das Zehnfache differieren können.

3. Der Tributyrasegehalt ist ein charakteristisches Merkmal eines Stammes, das über längere Zeit und durch viele Passagen hindurch absolut konstant bleibt.

4. Der Tributyrasegehalt steht in keinem erkennbaren Zusammenhang mit der Typenspezifität. Gerade die grössten Unterschiede fanden sich bei verschiedenen Vertretern desselben serologischen Typs. Diese Diskordanz zwischen Typenspezifität und Fermentgehalt ist insofern leicht zu verstehen, als die typenspezifischen Eigenschaften in der Polysaccharidfraktion der Bakterienkapsel verankert sind, während die hier untersuchten Fermente aus dem Zellinnern der Mikroorganismen stammen.

Wir werden in weiteren Untersuchungen festzustellen suchen, ob diese Fermentaktivität auch unter gänzlich veränderten Kulturbedingungen konstant bleibt, oder ob sie unter bestimmten Verhältnissen dauernd modifiziert werden kann.

Die beschriebene Tributyrase ist ein Endo-Ferment der Pneumokokken. In Übereinstimmung mit *Avery* und *Cullen* konnten wir feststellen, dass eine Pneumokokken-Kultur während der Wachstumsphase keine Tributyrase an das Milieu abgibt. Das Ferment wird erst nachweisbar, wenn eine teilweise Zellauflösung stattgefunden hat, und zwar steigt der Fermentgehalt mit zunehmender Zytolyse.

Die Pneumokokken-Tributyrase ist nicht imstande, Olivenöl zu spalten. Zwei Substanzen, deren intensives Hemmvermögen gegenüber der Tributyrase aus Menschenserum wir früher nachgewiesen haben, Tri-o-kresyl-phosphat und Tri-o-chlor-phenyl-phosphat¹⁾, vermögen das entsprechende Ferment aus Pneumokokken nicht zu beeinflussen. Ebenso blieb Calciumchlorid ohne Wirkung auf die Aktivität des Enzyms. Der Einfluss von Atoxyl²⁾, Chinin (Chininum hydrochloricum) und von Natriumfluorid geht aus Tabelle 2 hervor.

Tabelle 2.

Konzentration	Hemmung in % durch		
	Chinin	Atoxyl	NaF
0,5%	100	100	50—60
0,05%	100	70—80	10—20
0,005%	0	< 10	0

Da unsere Pneumokokkenaufschwemmungen mit Natriumcholat zur Autolyse gebracht wurden, enthielt das verwendete Fermentpräparat noch 5% dieses Gallensäuresalzes. Von einigen Autoren (Lit. bei *R. Ammon*³⁾) wurde nun eine aktivierende Wirkung von Gallensäuren auf verschiedene Lipasen festgestellt. Wir mussten daher prüfen, ob auch die Pneumokokken-Tributyrase dieser aktivierenden Wirkung unterliegt. Dies ist aber nicht der Fall. Im Gegenteil fanden wir, dass zusätzliche Mengen von Cholat das Ferment leicht hemmen, und zwar bewirkte eine Erhöhung der Cholatkonzentration auf das doppelte eine Hemmung von ca. 20%, der Zusatz der dreifachen Menge Natriumcholat eine etwa 30-proz. Hemmung. Umgekehrt entsprach die Fermentaktivität bei Cholat-freien Präparationen genau dem Grad der Autolyse (gemessen an der Trübung), so dass schon nicht ganz autolytierte Aufschwemmungen beinahe den Aktivitätsgrad der mit Cholat autolytierten erreichten, und unsere in Tabelle 1 angeführten Werte somit absolut eher zu niedrig, keinesfalls aber zu hoch liegen.

¹⁾ *H. Bloch*, *Helv.* **26**, 733 (1943).

²⁾ Herrn Prof. Dr. *S. Edlbacher* danken wir herzlich für die Überlassung von Atoxyl.

³⁾ *R. Ammon*, in *Nord-Weidenhagen*, *Handb. d. Enzymologie* I, 382. Leipzig 1940.

2. Cholin-esterase: Im Gegensatz zur Tributyrase wird die ChE durch Gallensalze deutlich gehemmt¹⁾. Dementsprechend hat *Schaller* seine Pneumokokken-Aufschwemmungen auch unter Weglassung von Cholaten durch Frieren und Auftauen autolytisiert. Wir haben versucht, seine Ergebnisse zu reproduzieren, indem wir uns ganz genau an die von *Schaller* angegebene Technik hielten. Aber weder mit dieser Methodik, noch durch Frieren bei wesentlich tieferen Temperaturen und über längere Zeit gelang es uns, klare, vollständig gelöste Suspensionen zu erhalten. Alle diese Präparationen enthielten auch nach tagelangem Stehen bei tiefen Temperaturen noch zahlreiche, mikroskopisch nachweisbare, ja sogar lebende, vermehrungsfähige Keime. Obschon wir mehrere Stämme von Pneumokokken auf ihren Gehalt an ChE untersuchten, konnten wir weder in gefrorenen, noch in mit Gallensalzen gelösten Bakterienaufschwemmungen eine Spur von ChE nachweisen. In keinem Fall wurde Acetyl-cholin auch nur geringfügig gespalten.

Zusammenfassung.

1. Pneumokokken enthalten eine Tributyrin spaltende Esterase. Der mengenmässige Gehalt an diesem Ferment ist von einem Bakterienstamm zum andern beträchtlichen Schwankungen unterworfen. Innerhalb desselben Stammes bleibt er aber unter gleichen Kulturbedingungen lange Zeit unverändert.

2. Bei diesem Fermentgehalt handelt es sich um eine konstante und charakteristische Stammeseigenschaft, die von der Typenzugehörigkeit des betr. Pneumokokkenstammes völlig unabhängig ist.

3. Pneumokokken enthalten keine Cholin-esterase.

Basel, Hygienisches Institut der Universität.

42. Partieller *Hofmann'scher* Abbau des Emetins sowie seine Dehydrierung zu Emetamin²⁾.

von A. Ahl und T. Reichstein.

(5. II. 44.)

Emetin ist das Hauptalkaloid der Brechwurzel *Radix Ipecacuanhae* und besitzt in hohem Masse die wertvollen therapeutischen Eigenschaften³⁾ dieser Droge, die besonders für die Bekämpfung der tropischen Amöbendysenterie geschätzt sind. Emetin⁴⁾ wurde wahrscheinlich zuerst von *Glénard*⁵⁾, dann von *Kunz-Krause*⁶⁾ ⁷⁾ ⁸⁾ sowie

¹⁾ R. Ammon, Erg. Enzymforsch. 9, 35 (1943).

²⁾ Auszug aus der Diss. A. Ahl, Basel 1943.

³⁾ L. Rogers, Brit. Med. J. 1912 (I) 1424; (II) 405.

⁴⁾ Der Name Emetin stammt von *Pelletier*, doch war das Präparat von *Pelletier* und *Magendie* (Ann. chim. physique 4, 172 (1817); J. pharm. chim. [2] 3, 145; 4, 322 (1817)) ein Gemisch.

⁵⁾ A. Glénard, J. pharm. chim. [4] 22, 175 (1875).

⁶⁾ H. Kunz, Arch. Pharm. 225, 461 (1887).

⁷⁾ H. Kunz-Krause, Arch. Pharm. 232, 466 (1894); Schweiz. Wschr. Chem. Pharm. 32, 961 (1894). ⁸⁾ Kunz-Krause, Arch. Gen. [3] 34, 290 (1895).