

Die Hemmung des Hefewachstums durch verschiedene Chinone.

(XIV. Mitteilung über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.)

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und **H. Fellner-Feldegg**.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 28. März 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 28. April 1949.)

In einer früheren Arbeit¹ haben wir bereits kurz über die Wirkung von Chinonen auf das Wachstum der Hefe berichtet. Die damaligen Untersuchungen wurden allerdings mit einer Methodik durchgeführt, deren Ergebnisse nur als halbquantitativ zu bezeichnen sind. Wir benötigen nun zur Prüfung der Frage, ob zwischen der durch Chinone verursachten Wachstumshemmung und der Wirkung dieser Substanzen auf einzelne aus Hefe isolierte Fermentsysteme bzw. auf bestimmte Stoffwechsellvorgänge der Hefezelle Beziehungen bestehen, eine möglichst genaue Kenntnis der durch die Chinone bewirkten fungistatischen Effekte. Daher haben wir unsere seinerzeitigen Versuche mit einer möglichst genauen Methodik unter exakt festgelegten Bedingungen wiederholt und auf eine Anzahl vorher nicht geprüfter Chinone ausgedehnt.

Methodik.

Als Testorganismen wurden zwei Reinzuchtstämme von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen verwendet, welche wir der Freundlichkeit von Herrn Prof. Dr. A. Szilvinyi von der Versuchsanstalt für das Gärungsgewerbe in Wien, XVIII., verdanken. Der eine der beiden Stämme zeigt die typischen Eigenschaften der Oberhefe und wächst optimal bei 26 bis 27°, während der andere — als Stamm Saaz (*Henneberg*) bekannt — eine Unterhefe ist, dessen optimale Wachstumstemperatur bei etwa 20° liegt.

Der für die Versuche verwendete Nährboden war Glucose-Peptonwasser (50 g Glucose, 10 g Pepton, 5 g NaCl auf 1000 ccm Wasser). Die Wirkstoffe

¹ Exper. 3, 327 (1947).

wurden wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit in Methanol gelöst zugegeben, wobei der Methanolgehalt der Nährböden immer 2% betrug. In Testversuchen konnten wir feststellen, daß der Methanolzusatz das Hefewachstum nur unwesentlich beeinflußt; außerdem wurden alle Blindversuche ebenfalls unter Zusatz von 2% Methanol durchgeführt. Die beiden Heferassen wurden je 48 Stunden bei ihren Optimaltemperaturen wachsen gelassen.

Die von uns verwendete nephelometrische Methodik ist an anderer Stelle beschrieben worden². Ihre Genauigkeit ist $\pm 4\%$.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Resultate unserer Hauptversuchsserien sind in den Tabellen 1. und 2. wiedergegeben. Sie stimmen in großen Zügen mit den von uns seinerzeit berichteten Ergebnissen¹ überein. Die Diskrepanzen lassen sich zwanglos damit erklären, daß wir damals mit einem anderen Hefestamm, den wir diesmal nicht wieder erhalten konnten, sowie auch unter anderen Versuchsbedingungen — vollsynthetischer Nährboden — gearbeitet haben. Die bei den jetzigen Untersuchungen verwendeten Stämme zeigen auf vollsynthetischem Nährboden überhaupt kein Wachstum.

Bei Vergleich der beiden Tabellen bemerkt man, daß die Unterhefe gegenüber der hemmenden Wirkung der Chinone durchwegs um einiges empfindlicher ist als die Oberhefe. Eine interessante Beobachtung ist, daß manche Substanzen unserer Reihe bei Konzentrationen, welche etwas unterhalb den noch hemmenden liegen, ausgesprochene Wachstumswirkungen zeigen. Es sei hier besonders auf das 4-Methoxytoluchinon hingewiesen, welches in einer Konzentration von $4,65 \cdot 10^{-5}$ molar bei Oberhefe eine Zunahme des Wachstums um 25%, bei Unterhefe sogar eine solche von 59% hervorruft. Diese Effekte sind ausgezeichnet reproduzierbar.

Besonders bemerkenswert erscheint uns auch die hohe fungistatische Potenz von Methylnaphthazarin (2-Methyl-5,8-dioxy-1,4-naphthochinon) und Phthiocol (2-Methyl-3-oxy-1,4-naphthochinon). Die erstgenannte Substanz hemmt das Wachstum der Unterhefe bei Konzentrationen von weniger als 1 : 2 Millionen total. Für diese Wirkung scheint die gleichzeitige Anwesenheit einer Methylgruppe und einer oder zweier Hydroxylgruppen notwendig zu sein, denn das Naphthazarin, das sich vom Methylnaphthazarin nur durch das Fehlen einer Methylgruppe unterscheidet, zeigt eine wesentlich geringere Hemmwirkung und ebenso ist das 2-Methyl-1,4-naphthochinon, welches zwar eine Methylgruppe, aber keine Hydroxylgruppe aufweist, nur wenig aktiv. Lawson (2-Oxy-1,4-naphthochinon), also die Substanz, die sich vom Phthiocol nur durch das Fehlen einer Methylgruppe unterscheidet, stand uns für die hier berichteten Versuche

² Österr. Chemiker-Ztg. 50, 68 (1949).

Tabelle 1. Wachstum des beschriebenen Oberhefestammes unter Konzentrationen von Chinonen

	Wachstum bei verschiedenen molarer			
	$1 \cdot 10^{-3}$	$4,65 \cdot 10^{-4}$	$2,15 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
n-Benzochinon			0	25
2,6-Dichlorbenzochinon	0	15	75	97
2,5-Dichlorbenzochinon		0	10	26
2,6-Dimethoxybenzochinon	0	38	90	103
Toluchinon			0	50
4-Methoxytoluchinon		0	5	115
Dichlorthymochinon				0
1,2-Naphthochinon			0	40
1,4-Naphthochinon				
2-Chlor-1,4-naphthochinon				0
2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon				
2-Methyl-1,4-naphthochinon	0	5	25	48
Naphthazarin				
Methylnaphthazarin				
Phthiocol				

Tabelle 2. Wachstum des beschriebenen Unterhefestammes unter Konzentrationen von Chinonen

	Wachstum bei verschiedenen molarer			
	$1 \cdot 10^{-3}$	$4,65 \cdot 10^{-4}$	$2,15 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
p-Benzochinon				0
2,6-Dichlorbenzochinon		0	5	28
2,5-Dichlorbenzochinon			0	22
2,6-Dimethoxybenzochinon	0	25	78	98
Toluchinon				0
4-Methoxytoluchinon		0	10	110
Dichlorthymochinon				
1,2-Naphthochinon				0
1,4-Naphthochinon				
2-Chlor-1,4-naphthochinon				
2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon				
2-Methyl-1,4-naphthochinon			0	14
Naphthazarin				0
Methylnaphthazarin				
Phthiocol				

nicht zur Verfügung; aus früheren Versuchen wissen wir, daß auch diesem Stoff keine wesentliche fungistatische Wirkung zukommt.

Wie schon in unserer früheren Mitteilung über dasselbe Gebiet⁴ erwähnt wurde, zeigen die gegenüber Bakterien sehr wirksamen Stoffe 2,6-Dimethoxybenzochinon und 4-Methoxytoluchinon vergleichsweise sehr geringe fungistatische Wirksamkeit.

den angeführten Bedingungen in Gegenwart verschiedener (Wachstum unter Normalbedingungen = 100).

Konzentration der Wirkstoffe

$4,65 \cdot 10^{-5}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4,65 \cdot 10^{-6}$	$2,15 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$4,65 \cdot 10^{-7}$	$2,15 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$
46	70	90	100					
104	101	96	102					
53	75	104						
118	110	104	104					
125	105	99						
50	96	98	104	100				
85	102	104	104					
0	40	98	96	102				
17	55	93	108	102				
	0	5	31	55	75	102	99	
67	85	99	115	105				
0	22	60	98	102	98			
			0	7	52	99	103	101
			0	38	81	106	105	106

den angeführten Bedingungen in Gegenwart verschiedener (Wachstum unter Normalbedingungen = 100).

Konzentration der Wirkstoffe

$4,65 \cdot 10^{-5}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4,65 \cdot 10^{-6}$	$2,15 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$4,65 \cdot 10^{-7}$	$2,15 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$
10	60	88	100					
51	76	98	96					
95	105	98						
27	60	95	103					
159	120	103						
0	27	60	95	103				
22	60	94	101					
	0	55	96	104				
0	43	78	96	98				
		0	12	32	45	74	95	
36	80	103	106	101				
8	45	81	98	96				
				0	29	78	97	100
			0	21	42	69	91	102

Eine ausführliche Besprechung der möglichen Mechanismen für die antibiotischen Wirkungen der Chinone wurde vor einiger Zeit von einem von uns³ an anderer Stelle veröffentlicht. Die vorliegenden Resultate geben keinen Anlaß zu einer Abänderung der damals vorgebrachten Anschauungen. Andererseits wurden in unserem Laboratorium eine Anzahl weiterer Untersuchungen über den Mechanismus der antibiotischen Effekte

der Chinone durchgeführt, welche in den nächsten Mitteilungen dieser Reihe publiziert werden sollen. Die Schlußfolgerungen, welche sich aus den hier berichteten und den in den späteren Arbeiten geschilderten Resultaten auf den Wirkungsmechanismus unserer Substanzen ergeben, sollen in einer späteren gesonderten Mitteilung veröffentlicht werden.

An dieser Stelle wollen wir uns nur noch mit den Anschauungen von Woolley⁴ auseinandersetzen. Auf Grund von *in extenso* publizierten Versuchen glaubt Woolley annehmen zu müssen, daß die Wirkung von 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon auf Hefe und andere Mikroorganismen

Tabelle 3. Versuche über den Antagonismus zwischen 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon

und 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Wachstum unter Normalbedingungen = 100).

Konzentration der Wirkstoffe im Nährboden		Wachstum der Oberhefe
2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon	2-Methyl-1,4-naphthochinon	
$1 \cdot 10^{-5}$	0	5
$4,65 \cdot 10^{-6}$	0	31
$2,15 \cdot 10^{-6}$	0	55
$1 \cdot 10^{-6}$	0	75
$4,65 \cdot 10^{-7}$	0	108
$2,15 \cdot 10^{-7}$	0	102
0	$4,65 \cdot 10^{-5}$	67
0	$2,15 \cdot 10^{-5}$	85
0	$1 \cdot 10^{-5}$	99
0	$4,65 \cdot 10^{-6}$	115
$2,15 \cdot 10^{-6}$	$4,65 \cdot 10^{-5}$	47
$2,15 \cdot 10^{-6}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	81
$2,15 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	65
$2,15 \cdot 10^{-6}$	$4,65 \cdot 10^{-6}$	65
$4,65 \cdot 10^{-6}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	84
$2,15 \cdot 10^{-6}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	81
$1 \cdot 10^{-6}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	84
$4,65 \cdot 10^{-7}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	81
$2,15 \cdot 10^{-7}$	$2,15 \cdot 10^{-5}$	84

zumindest teilweise darauf beruht, daß diese Substanz eine Struktur-analogie mit vitamin-K-aktiven Stoffen aufweist und die Verwertung dieser für die Mikroorganismen notwendigen Stoffwechselteilnehmer („essential metabolites“) kompetitiv hemmt. Durch Zugabe von geringen Mengen von vitamin-K-aktiven Substanzen, so insbesondere 2-Methyl-1,4-naphthochinon, sei es möglich, die durch 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon bei Hefe (Woolley spricht von *Saccharomyces cerevisiae* ohne nähere Spezifizierung) verursachte Hemmung zu verringern oder sogar aufzuheben.

Wir hatten schon in unserer seinerzeitigen Mitteilung¹ über Versuche berichtet, die Anschauungen und Ergebnisse des amerikanischen Forschers zu verifizieren, konnten aber damals mit dem verwendeten Hefematerial und unserer damaligen Methodik keine Ergebnisse erhalten, welche eine Stütze dieser Auffassungen bilden konnten. Wegen des

³ O. Hoffmann-Ostenhof, Science (Newyork) 105, 549 (1947).

⁴ D. W. Woolley, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 60, 225 (1945).

Die angeführten Ergebnisse zeigen nun, daß man tatsächlich eine teilweise Aufhebung der von dem einen Wirkstoff verursachten Hemmeffekte durch den anderen in bestimmten Konzentrationsbereichen beobachten kann. Es ist also möglich, daß die von *Woolley* vertretene Ansicht, wonach vitamin-K-aktive Substanzen im Stoffwechsel der Hefezelle die Rolle von „essential metabolites“ spielen, zutrifft. Andererseits könnte, wie *Woolley* selbst feststellt, es sich hier möglicherweise auch nur um ein unspezifisches Phänomen handeln, wobei also zwei zellfremde Substanzen sich in einem Wettbewerb um einen Angriffspunkt an der Hefezelle befinden und diese entweder von der einen oder von der anderen Substanz beeinflußt wird. Dafür spricht auch die Tatsache, daß es bisher noch niemals gelungen ist, vitamin-K-aktive Substanzen in der Hefe nachzuweisen. Immerhin muß, wie *Woolley* betont, die Unmöglichkeit des Nachweises noch nicht unbedingt bedeuten, daß Vitamin K nicht doch eine wesentliche Rolle für die Hefe spielt, da die Ungenauigkeit der bisherigen Nachweismethoden es nicht gestattet, sehr kleine Mengen dieser Stoffe zu bestimmen.

Jedenfalls muß aber auch unter der Annahme, daß 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon ein spezifischer Antagonist von für die Hefezelle notwendigen vitamin-K-artigen Substanzen ist, festgestellt werden, daß — wie auch schon *Woolley* in einem Brief an den erstgenannten Autor dieser Mitteilung betont hat — dieser Mechanismus bestenfalls als Teilfaktor für die antibiotischen Wirkungen des 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinons und vielleicht noch einiger anderer Derivate des 1,4-Naphthochinons in Frage kommt.

Anmerkung bei der Korrektur: In einer uns erst nach Abfassung der vorliegenden Mitteilung zugänglich gewordenen Arbeit berichtet *Schopfer*⁵ über die Wirkung von 2-Methyl-1,4-naphthochinon und anderen Naphthochinonen auf das Wachstum verschiedener Mikroorganismen. Bei *Lactobacillus fermentum* 36 und auch bei *Ustilago violacea* kann er einen Antagonismus zwischen Halogen-naphthochinonen und Vitamin K₃ feststellen. Außerdem schließt er aus seinen Versuchen auf die Existenz eines Antagonismus zwischen 2-Methyl-1,4-naphthochinon und Nicotinsäure.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Mitteilung wird über die Wirkung einer größeren Anzahl von Derivaten des Benzochinons und der beiden Naphthochinone auf das Wachstum eines Oberhefe- und eines Unterhefestammes berichtet. Als stärkste Hemmstoffe des Hefewachstums erwiesen sich Methyl-naphthazarin und Phthiocol, von denen das erste schon in einer Verdünnung von 1:2500000 Totalhemmung verursacht. Manche Wirkstoffe dieser Gruppe zeigen in Konzentrationen, welche knapp unter

⁵ *W. H. Schopfer* und *M. L. Boss*, Arch. Sciences 1, 521 (1948).

den noch hemmenden liegen, ausgesprochen fördernde Wirkung auf das Hefewachstum, was sich in einem Falle (4-Methoxytoluchinon) in einem um 59% gegenüber dem Blindversuch vermehrten Wachstum der Hefe auswirkt.

Schließlich werden Versuche mitgeteilt, welche zur Prüfung der Anschauung von *Woolley*, daß 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon zumindest einen Teil seiner Hemmwirkung durch kompetitive Verdrängung der für die Hefezelle möglicherweise lebenswichtigen vitamin-K-aktiven Stoffe ausübt, angestellt wurden. Die Ergebnisse stützen die von *Woolley* erbrachten Befunde.