

As can be seen from Table 1 new keto acids, in addition to 1, 2, 8, and 17, originally found in milk, were not found in the milk culture of *Str. thermophilus*, whereas in the culture of *L. helveticus* small amounts of 3, 5, and 9, and a larger amount of 16 were found. In the culture solution of propionic acid bacteria keto acid 7 was found after 3 days in addition to 1, 2, 16, and 17 which were present in the nutrient solution from the beginning, after 16 days keto acid 8, whereas after 19 days only keto acids 2 and 17 remained.

3- to 6-month-old Emmental cheese contains keto acids 1, 2, 8, 16, and 17; 12-month-old Emmental cheese keto acids 3 and 5 in addition. In the fluid secreted in the eyes of older cheese only keto acids 2, 3, and 17 were found.

In mouldy cheese (Roquefort) keto acids 1, 2, 3, 4, 5, 16, and 17 were found.

1. Alfthan, M. and Virtanen, A. I. *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 86.
2. Kreula, M. and Virtanen, A. I. *Proceedings of the XIVth International Dairy Congress, Roma 1* (1956) 802.

Received July 25, 1957.

Über einen antifungalen Faktor aus den grünen Teilen der Heidelbeerpflanze (*Vaccinium myrtilus*)

K. RAIBLE* und ARTTURI I. VIRTANEN

*Laboratorium der Stiftung für chemische
Forschung, Biochemisches Institut,
Helsinki, Finnland*

In früheren Arbeiten aus diesem Laboratorium konnte gezeigt werden, dass alle bisher untersuchten Kulturpflanzen Stoffe enthalten, die das Wachstum des pflanzenpathogenen Pilzes *Fusarium nivale* und vieler anderer Pilze zu hemmen vermögen, und dass mit der Anwesenheit solcher Stoffe die Resistenz bezw. die Anfälligkeit der betreffenden Pflanze gegenüber dem

genannten Mikroorganismus erklärt werden kann¹. Aktive Substanzen sind bisher in reinem Zustand aus jungen Roggen², Weizen- und Maispflanzen³ sowie auch aus Rotklee⁴ isoliert und chemisch charakterisiert worden. Wir haben in letzter Zeit auch einige wilde Pflanzen auf das Vorkommen antifungaler Substanzen untersucht. In den grünen Teilen der Heidelbeerpflanze (*Vaccinium myrtilus*) haben wir eine ungewöhnlich hohe Aktivität gegen *Fusarium nivale* gefunden. Die Aktivität ist im frischen Laub während der Frühjahrsmonate ebenso nachzuweisen wie in altem Laub und auch in den Stengeln während des Winters, wobei auch stets die Menge an dem aktiven Stoff etwa die gleiche ist. Die antifungale Wirksamkeit 70 % alkoholischer Extrakte (Presssäfte können wegen des geringen Wassergehaltes der Pflanzen meist nur in unzureichendem Mass gewonnen werden) beträgt etwa 15 Einheiten, d.h. aus 1 g Pflanzenmaterial gewonnener Extrakt reicht aus um das Wachstum von *Fusarium nivale* auf 15 ml Hafermehlagermedium völlig zu hemmen. Zusammensetzung des Mediums: 50 g Hafermehl, 5 ml Glycerin, 1,5 ml Milchsäure, 7 g KHPO₄, 35 ml 0,2 M Na₂HPO₄-Lösung, 1 000 ml Wasser. pH des Mediums 4,7–4,8.

Untersuchungen über die Art des antifungalen Faktors ergaben, dass es sich hierbei offenbar um eine gerbstoffartige Substanz oder um ein Gemisch von solchen Stoffen handelt. Der antifungale Faktor ist gut löslich in Wasser, Äthanol, Methanol und Aceton, unlöslich hingegen in wasserfreiem Äther, Petroläther und Benzol. Die Substanz reagiert neutral und passiert daher sowohl den sauren Amberlite-Jonenaustauscher IR 120 als auch die stark basischen Harze IRA 410 und IRA 400.

Aktive Extrakte mit 10–15 Einheiten pro 1 g Pflanzenmaterial konnten erhalten werden beim Variieren der Extraktionsmethoden und -temperaturen wie folgt:

- 1) 100 g Pflanzenmaterial + 500 ml 60 % Äthanol, 3 Std digeriert, abgepresst, Presskuchen nochmals ebenso behandelt.
- 2) Wie 1, jedoch 12–14 Std digeriert bei Zimmertemperatur oder bei –5°C.
- 3) 100 g Pflanzenmaterial + 1 l Methanol 12 und 48 Std digeriert, dann weiter wie bei 1.
- 4) Wie 3, jedoch Zusatz von 5 und auch 10 g K-metabisulfit (Extrakt vor dem Test selbstverständlich durch sauren und basischen Ionenaustauscher geleitet).

* Die jetzige Adresse: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München 23, Leopoldstrasse 175, Deutschland.

5) Wie 3, jedoch Zusatz von 5 g Ascorbinsäure.

6) Wie weiter unten angeführt wird.

Als der einfachste Weg zur Gewinnung weitgehend vorgereinigter Rohkonzentrate erwies sich folgende Arbeitsweise: 1 kg grüne Pflanzenteile werden in 4 l *n*-Butanol mit Hilfe eines Mix-Gerätes zerkleinert und über Nacht bei Zimmertemperatur digeriert. Dann wird abgepresst. Der Presssaft wird verworfen, der Presskuchen einige Stunden in 5 l 70 % Äthanol digeriert. Man presst wiederum ab und erhält eine gelb gefärbte Lösung, die den aktiven Faktor enthält. Sie wird sodann im Vakuum auf etwa 1 l wässrige Lösung konzentriert. Man schickt sie dann durch die Ionenaustauscher IR 120 und IRA 410 oder IRA 400. Sodann wird wiederum im Vakuum konzentriert und schliesslich durch Lyophilisation völlig getrocknet. Man erhält etwa 20 g gelb-braunes, stark hygroskopisches Pulver, das die gesamte Aktivität enthält.

Mit diesem Lyophilisat angestellte Versuche zeigten, dass aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von NaCl bis zur Sättigung der grösste Teil der gelösten Stoffe als voluminöser brauner Niederschlag gefällt wird, wobei der aktive Faktor in der Fällung enthalten ist. Ph-Acetat fällt aus 60 % äthanolischer Lösung ebenfalls den grössten Teil der Trockensubstanz und auch den aktiven Faktor. Bei Zusatz von Essigsäure geht die gesamte Fällung wieder in Lösung. Ebenso ist aus alkoholischer Lösung der Hauptteil der Trockensubstanz und des antifungalen Faktors mit K-Acetat fällbar. Aluminium-Oxyd wirkt in wässrigen, alkoholischen und auch essigsäurehaltigen Lösungen stark absorbierend sowohl auf die gesamten gelösten Stoffe als auch auf den antifungalen Faktor.

Bei längerer Aufbewahrung nimmt die antimikrobielle Wirksamkeit des Lyophilisates allmählich ab, wobei auch seine Farbe dunkler wird. Dies ist auch in wässrigen und alkoholischen Lösungen zu beobachten. Alkalische Reaktion fördert diesen Prozess stark. Es ist noch nicht eindeutig geklärt, ob diese Veränderungen allein durch Polymerisations- oder Kondensationsvorgänge bedingt sind, oder ob dabei auch Oxydationsprozesse mitspielen.

Bei chromatographischer Analyse des Lyophilisates auf Whatman-1-Papier ergab lediglich die Anwendung des folgenden Fließmittels eine Auftrennung: Äthylacetat (2 Teile), Eisessig (1 Teil), Wasser (2 Teile), Äthanol (0,35 Teile). Hierbei liess sich bei R_F 0,9 eine abgegrenzte, im UV-

Licht hellblau fluoreszierende Zone erkennen, gefolgt von einem schwach absorbierenden Schwanz bis R_F etwa 0,2. Beräuchern mit Ammoniak verstärkt die Fluoreszenz. Die fluoreszierende Zone gibt auf dem Papier folgende Reaktionen: Mit $FeCl_3$ dunkelgrüne Färbung, mit Benzidin-Reagenz erst hell-orange-rote Färbung, die aber rasch etwas dunkler wird, mit ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung schwarzbraune Färbung. Im Gegensatz dazu ergibt der Schwanz auf dem Papier mit Eisenchlorid eine blaue Färbung und mit Benzidin eine orange Farbe, wie sie sich bei der fluoreszierenden Zone im nachgedunkelten Zustand erst einstellt.

Bei präparativer Chromatographie an der Zellosesäule mit dem oben angegebenen Fließmittel konnten wir auch bei sehr schön gleichmässig laufenden Säulen nur eine gewisse Anreicherung der fluoreszierenden Substanz erzielen, nicht jedoch deren Isolierung. Es zeigte sich nämlich bei papierchromatographischer Untersuchung, dass alle Fraktionen um R_F 0,9, die allein aus der fluoreszierenden Substanz hätten bestehen müssen, auch die nicht fluoreszierende, schwanzbildende Substanz mitenthielten. Diese Substanz entsteht wahrscheinlich aus dem fluoreszierenden Stoff. Die Ergebnisse des mikrobiologischen Tests lassen darauf schliessen, dass der antifungale Faktor wahrscheinlich nicht die fluoreszierende Substanz selbst ist, sondern eines oder mehrere ihrer Umwandlungsprodukte, welche aber auch schon in der Pflanze vorhanden sind.

Alle diese Beobachtungen, sowie eine Reihe weiterer Feststellungen führten zu der bereits ausgesprochenen Annahme, dass der antimikrobiell wirkende Faktor von *Vaccinium myrtillus* ein gerbstoffartiger Stoff ist und vermutlich der Gruppe der nicht hydrolysierbaren oder kondensierten Gerbstoffe angehört (vgl. hierzu Schmidt ⁵). Hierfür spricht des weiteren die Feststellung, dass sich bei Hydrolyse des Lyophilisates durch 1 stündiges Kochen in 1 N HCl-Lösung — offenbar durch Polymerisation — lediglich schwarzbraune, wasserunlösliche, amorphe Produkte ohne antimikrobielle Wirksamkeit bilden, in denen sich auch in einer grossen Anzahl verschiedener Fließmittel auf papierchromatographischem Weg keine irgendwie definierbaren phenolischen oder zuckerartigen Stoffe nachweisen lassen.

1. Virtanen, A. I. *Giorn. Microbiol.* 2 (1956) 15.

2. Virtanen, A. I. und Hietala, P. K. *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 1543.
3. Virtanen, A. I., Hietala, P. K. und Wahlroos, Ö. *Suomen Kemistilehti B* **29** (1956) 143.
4. Virtanen, A. I. und Hietala, P. K. *Suomen Kemistilehti B* **30** (1957) 99.
5. Schmidt, O. Th. *Natürliche Gerbstoffe* in Paech, K. und Tracey, M. V. *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955, Bd. 3, S. 517.

Eingegangen am 5. August 1957.

Structure of Elastin

1. Analysis of Some Acid Peptides

A. KÄRKELÄ and E. KULONEN

Department of Medical Chemistry, University of Turku, Finland

This preliminary communication is meant to contribute to the discussion on the relations between collagen and elastin. Burton and co-workers¹ claimed, mainly on electronmicroscopic evidence, that collagen is transformed to elastin without being degraded to amino acids. If this theory were correct, the peptides from elastin should present similarities with those known from collagen²⁻³.

Elastin was prepared from bovine nuchal ligament. Other non-collagenous proteins were extracted from the finely ground tissue exhaustively with 0.2 M disodium phosphate solution, and collagen subsequently with boiling water for five days.

Partial hydrolysates were made with hydrochloric acid² (5% protein in 4 N acid was kept for a week at +37° C). The acid was removed by repeated evaporations and a sirupy dark-brown mass obtained. It dissolved completely in 10% trichloroacetic acid. This material was fractionated using the method by Moore and Stein⁴ with slight modifications. The resulting curve is presented as Fig. 1.

It is quite obvious that this procedure does not provide a very suitable method for structural analysis of elastin. The separations are not clear and the number of peptides produced seems small.

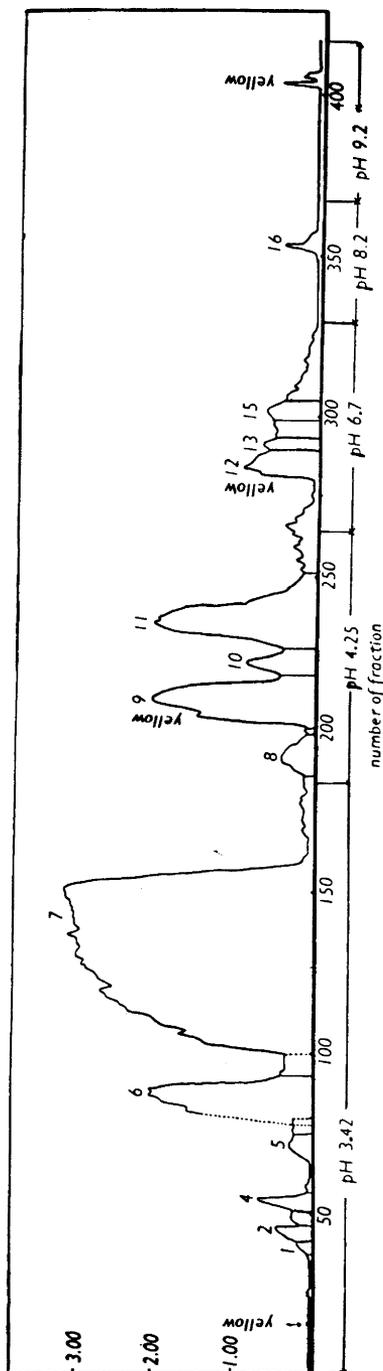


Fig. 1. Fractionation of partial hydrolysate of elastin (360 mg, for preparation see the text) in Dowex-50 column⁴. The last peak was obtained with 0.2 N NaOH. Two-ml fractions were collected (from pH 9.2 onwards 4 ml). The colour was developed from 0.2 ml samples taken from the fractions and the ordinate indicates the extinction in 1 cm cell. The numbers outside the curve refer to the text.