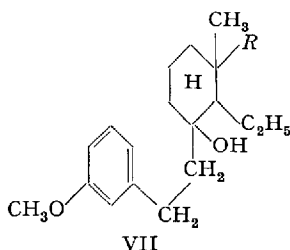


methylalkoholischer Chlorwasserstofflösung erhaltene Methylester (II, $R = \text{CH}_3$; Siedepunkt, 92–93°; Semi-carbazon, Schmelzpunkt 210–212°; 2,4-Dinitrophenylhydrazon, Smp. 138°) wurde mit Kalium-*m*-methoxyphenylazetylid⁸ in tertiärem Butylalkohol umgesetzt. Hierbei entstand in guter Ausbeute das Azetylderivat vom Sdp._{0,2} 195–200°, der Bruttoformel $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$ (offensichtlich III), das bei der Hydrierung an Palladium quantitativ 2 Mol Wasserstoff aufnahm und in eine Verbindung der Bruttoformel $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$ überging; beim Kristallisieren aus Petroläther wurden 40% eines kristallinen Anteiles vom Schmelzpunkt 70° gewonnen. Die Verbindung entspricht auf Grund ihrer Summenformel, des Ergebnisses der Methoxylbestimmung, der Laktontitrierung und schliesslich auch ihres infraroten Spektrums⁹ dem Lakton der 1-(2-*m*-Methoxyphenyl-äthyl)-2-äthyl-3-methylcyclohexanol-3-carbonsäure (IV).

Zur weiteren Charakterisierung dieser Verbindung zogen wir die alkalische Hydrolyse heran, bei der wir eine kristalline Hydroxysäure (VII, $R = \text{COOH}$) vom Schmelzpunkt 106° erhielten, die sehr unbeständig war und beim Erwärmen leicht in das Ausgangslakton überging. Zum gleichen Zweck diente auch die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid, wobei ein um 4 Wasserstoffatome reicherer kristalliner Stoff vom Schmelzpunkt 87° entstand, offenbar das Diol VII ($R = \text{CH}_2\text{OH}$).



Das Lakton IV wurde mittels Chlorwasserstoff und Aluminiumchlorid in siedendem Benzol zyklisiert. Als Reaktionsprodukt isolierten wir in guter Ausbeute eine amorphe, teilweise demethylierte Carbonsäure. Sie wurde deshalb mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung methyliert und hierauf mit Diazomethan esterifiziert. Der entstandene Methylester wurde chromatographisch gereinigt und destilliert (Sdp._{0,08} 190°); seine Bruttoformel war $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ und entsprach dem erwarteten 7-Methyl-doisylnsäure-methylester (V, $R = \text{CH}_3$). Die durch alkalische Verseifung erhaltene amorphe Säure (Smp. 50–60°) wies im Test nach BÜLBRING und BURN an infantiler kastrierten Rattenweibchen eine dem Östradiolbenzoat ungefähr gleiche östrogene Wirksamkeit auf¹⁰.

Diese amorphe Säure ist in warmer Natriumcarbonatlösung löslich und scheidet sich beim Abkühlen der Lösung zum Teil in Form eines kristallinen Natriumsalzes aus. Beim Ansäuern der Lösung dieses Salzes erhielten wir die kristalline Monocarbonsäure $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$ (V, $R = \text{H}$), die sich aus Methanol kristallisieren lässt und bei 189–191° schmilzt. Dieser Schmelzpunkt stimmt

mit den Angaben von ANNER und MIESCHER⁴ für die hochwirksamen Stereoisomeren der 7-Methyl-doisylnsäure A α (Smp. 187–188°) und C β (Smp. 189–191°) überein und nähert sich ihrer Angabe für das Stereoisomere C α (Smp. 179–181°). Ein direkter Vergleich unserer Substanz mit den erwähnten Stereoisomeren A α , C α und C β , der durch die ausserordentliche Liebeshwürdigkeit des Herrn Dr. G. ANNER in den Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft in Basel erfolgte, deutet darauf hin, dass unser Produkt höchstwahrscheinlich mit dem Stereoisomeren C α der Konfiguration *cis-anti-cis* identisch ist. Die infraroten Spektren beider Substanzen sind identisch und der Mischschmelzpunkt beider Proben, deren Schmelzpunkte etwas unterschiedlich sind, zeigte nur eine ganz geringe Depression. Hingegen weisen die Mischschmelzpunkte mit den Stereoisomeren A α und C β beträchtliche Depressionen auf, und auch in den infraroten Spektren sind sichtliche Unterschiede. Die wiederum mittels des gleichen Testes¹⁰ bestimmte östrogene Wirksamkeit unserer kristallinen Säure ist dieselbe wie die der amorphen Probe, das heisst, sie kommt der Wirksamkeit des Östradiolbenzoats gleich.

Durch Demethylierung unserer Substanz mit Pyridinhydrochlorid erhielten wir eine neue Doisylnsäure (VI) vom Schmelzpunkt 113–117° (Methanol), deren Analyse der Zusammensetzung $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ entspricht.

M. PROTIVA, J. O. JÍLEK,
E. ADLEROVÁ und L. NOVÁK

Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie in
Prag, den 1. Oktober 1956.

Summary

A new synthesis is described of a crystalline 7-methyl-doisylnic acid showing a strong estrogenic activity. This acid is probably identical with the stereoisomer C α of ANNER and MIESCHER. Demethylation of this methoxyacid yields a new doisylnic acid of mp. 113–117° (hydrate).

Die Wasserbestimmung in Zellmaterial von *Saccharomyces cerevisiae* nach KARL FISCHER

Im Verlaufe unserer Versuche mit Kulturweihenfen suchten wir nach Bestimmungsmethoden für Nass- und Trockengewicht, welche auch beim Vorliegen von kleinen Mengen Zellmaterial hinreichend genaue Resultate ergeben. Die Reproduzierbarkeit des Wassergehaltes von «Nasshefe» durch standardisierte Zentrifugation ist bei Hefemengen unter 1 g besonders gering¹, und die Genauigkeit der üblichen Trockensubstanzbestimmung lässt rasch nach, wenn die dabei verwendeten Glasfiltertiegel mehrmals im Gebrauch waren (vgl. auch WHITE¹, S. 138). Da für unsere Zwecke die Wasserbestimmung nach KARL FISCHER mehrere Vorteile aufweist (kleinere Probemengen, rasche Ermittlung der Resultate, Eignung für Routineanalysen), haben wir versucht, dieses Verfahren auch an feuchtem Zellmaterial von Kulturhefen durchzuführen.

Die Ermittlung des «Nassgewichtes»

Die Hefezellen wurden durch ein Bakterienfilter Co5 (Membranfilter, Göttingen) aus der Nährlösung abfiltriert und mit $2 \times 20 \text{ ml}$ Wasser auf dem gleichen Filter

⁸ W. S. JOHNSON, D. K. BANNERJEE, W. P. SCHNEIDER, C. D. GUTSCHE, W. E. SHELBERG und L. J. CHINN, J. Amer. chem. Soc. 74, 2832 (1952). – O. EXNER, V. ŠIMÁK, J. O. JÍLEK und M. PROTIVA, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 19, 330 (1954).

⁹ Das Spektrum wurde von Herrn Dr. E. KNOBLOCH in der physikalisch-chemischen Abteilung unseres Institutes aufgenommen.

¹⁰ Die östrogene Wirksamkeit wurde von Herrn Dr. V. JELÍNEK in der physiologischen Abteilung unseres Institutes bestimmt.

¹ J. WHITE, Yeast Technology (London 1954), S. 143.

nachgewaschen. Wir achteten darauf, dass am Schluss das Wasser unter reproduzierten Bedingungen abgesaugt wird, und stellten zum Beispiel das angelegte Vakuum ab, nachdem die Oberfläche der Hefeschicht eine gleichmässig matte Farbe angenommen hatte. Wie Tabelle I zeigt, können auf diese Weise sehr gut reproduzierbare Werte erhalten werden.

Tabelle I

Beispiel für die Reproduzierbarkeit des Wassergehaltes von nasser Hefe. Saugmethode.

Bestimmung	Wassergehalt %	δ
1	73,5	- 0,3
2	74,3	+ 0,5
3	73,9	+ 0,1
4	73,6	- 0,2
Durchschnitt	73,8	0,3

Wir verwenden dieses Verfahren nicht nur zur Herstellung von Zellsuspensionen bekannter Konzentration, sondern auch bei Wachstumsversuchen für die Bestimmung der gebildeten Hefemenge, da sich die Hefeschicht verlustfrei vom Filter abheben lässt.

Die Bestimmung des Wassergehaltes mit Karl-Fischer-Reagens

50–80 mg der auf die oben beschriebene Art zubereiteten Nasshefe wurden abgewogen und sofort in 10 ml Methanol suspendiert. Nach 5–10 min titrierten wir mit Karl-Fischer-Lösung² so lange, bis der Farbumschlag mindestens 5 min erhalten blieb. Zu diesem Zwecke gibt man nach Erscheinen der ersten bräunlichen Farbtöne noch einige Tropfen zu. Versuchshalber wurde auch elektrometrisch titriert (dead-stop-Methode), doch liess sich damit keine Verbesserung im Erfassen des Endpunktes erreichen. Als Titrationsgefässe dienten 50 ml fassende, mit Aluminiumfolie zugedeckte Erlenmeyerkölbchen. Es wurde darauf geachtet, dass die Probe ungefähr die gleiche Menge Reagens verbrauchte wie die zur Bestimmung des Titors vorgelegte Wassermenge³.

Tabelle II

Trockensubstanzgehalt von Zellmaterial der Kulturhefe «Herrliberg», bestimmt nach KARL FISCHER bzw. nach Trocknung bei 105°C.

Hefematerial ⁴	Trockensubstanzgehalt bezogen auf das Nassgewicht in %	
	KARL FISCHER	Trocknung 105°C
Kultur 3 Tage alt, Substrat B'	24,2	24,4
Kultur 4 Tage alt, Substrat B', 1. Best. . .	27,4	27,4
Kultur 4 Tage alt, Substrat B', 2. Best. . .	27,5	27,2
Kultur 5 Tage alt, Substrat B'	29,8	29,1
Kultur 3 Tage alt, Substrat C	24,2	24,4
Kultur 4 Tage alt, Substrat C	28,0	27,3

² Von Fluka, Buchs.

³ E. BONAUGURI und G. SENIGA, Z. anal. Chem. 144, 161 (1955).

⁴ Bezüglich der Substratzusammensetzung siehe T. WIKÉN und O. RICHARD, Ant. van Leeuwenhoek 17, 209 (1951). Substrate ohne Vitaminzusatz.

Unter Verwendung von neuen Filtertiegeln 1 G 4 verglichen wir die Titrationsmethode mit den Ergebnissen der Trocknung bei 105°C (Tabelle II).

Diese Resultate zeigten, dass die titrimetrische Bestimmung durch andere Substanzen nicht gestört wird. Die Genauigkeit beträgt $\pm 0,5\%$.

Die Abhängigkeit des Trockensubstanzgehaltes vom Alter der Hefekulturen

Im folgenden bestimmten wir mit der Karl-Fischer-Methode die Trockensubstanz an Zellmaterial, welches wachsenden Kulturen der Weinheferasse «Herrliberg» in 24stündigen Abständen entnommen worden war. Zu diesem Zwecke stellten wir eine Anzahl von 100 ml fassenden Erlenmeyerkolben mit je 40 ml Substrat bereit und impften mit Hilfe einer desinfizierten Mikropipette gleiche Mengen einer Suspension von 3 Tage alten Zellen. Die für die tägliche Bestimmung notwendige Anzahl Kulturkolben wurde der aufgestellten Serie wahllos entnommen. In zahlreichen Versuchen konnte beobachtet werden, dass der Gehalt an Trockensubstanz mit zunehmendem Alter beträchtlich ansteigt. Der betreffende Wert für eine bestimmte Altersstufe hängt dabei nicht nur von den Züchtungsbedingungen, sondern auch von der angewandten Impfmenge ab. Bei schwacher Impfung steigt der Gehalt im Verlaufe von 7 Tagen von etwa 20% auf über 30% an. Ist die Impfung stärker, werden die TS-Werte von 30 und mehr Prozent bereits nach 4 bis 5 Tagen erreicht. Tabelle III enthält zwei Beispiele dieses Anstieges, wenn das synthetische Substrat B', bzw. natürlicher Traubensaft als Nährlösung verwendet wurden.

Tabelle III

Zunahme des Trockensubstanzgehaltes von «Herrliberg»-Zellen aus Kulturen steigenden Alters.

Alter der Kultur in Tagen	% Trockensubstanz	
	Substrat B'	Traubensaft
1	19,9	—
2	23,5	20,3
3	25,4	23,2
4	27,6	25,7
5	30,7	27,0
6	32,9	28,2
7	33,8	30,9

Diese Änderung des TS-Gehaltes kehrte in allen Versuchen mit einer solchen Regelmässigkeit wieder, dass die Bestimmung dieses Wertes in einer unbekannten Kultur ein gutes Mass für den Anteil an «jungen» und «alten» Zellen darstellt. Im Zusammenhang mit anderen Versuchen konnte beobachtet werden, dass die hohen TS-Gehalte von 30 und mehr Prozent stets nach der Aufnahme des assimilierbaren Zuckers auftreten. Werte von 20 bis 25% sind nur feststellbar, solange pro Volumeneinheit Substrat wenig Zellmaterial gebildet ist und die Kultur sich im Stadium der raschen Vermehrung befindet.

WIKÉN und RICHARD⁵ haben in ihren Versuchen ebenfalls grosse Unterschiede im Anteil der festen Substanz bestimmen können; die Werte lagen dort je nach Alter der Kultur, Heferasse und Substratzusammensetzung zwischen 12,7 und 28,2%. Dass diese Werte als Gesamtes betrachtet bedeutend tiefer lagen, dürfte

⁵ T. WIKÉN und O. RICHARD, Ant. van Leeuwenhoek 19, 279 (1953).

darauf zurückzuführen sein, dass das Nassgewicht nach standardisierter Zentrifugation ermittelt wurde.

Die erhaltenen Befunde berühren jene Ergebnisse kaum, wo mit Zellmaterial aus mehr oder weniger ausgenützten Substraten gearbeitet wird, wie dies hauptsächlich in Bestimmungen von Hefemenge, Substratausnutzung usw. für praktische Zwecke zutrifft. Dagegen erhält man fehlerhafte Resultate, wenn beispielsweise Gasumsätze (O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe) von ganz jungen Kulturen mit solchen von alten auf die Trockensubstanz bezogen werden. Das Nassgewicht stellt in diesen Fällen die bessere Bezugsgrösse dar (THORNE⁶). Wenn im übrigen der Trockensubstanzgehalt über die Zusammensetzung der Zelle auch keine näheren Aufschlüsse zu geben vermag, stellen die angeführten Zahlen doch einen weiteren Hinweis auf die grossen Veränderungen dar, welchen die Zelle im Verlaufe ihres Wachstums unterliegt.

A. FIECHTER und U. VETSCH

Sektion für Getränkechemie und -biologie der Eidgenössischen Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil, den 10. Januar 1957.

Summary

A method for the determination of wet and dry weight, has been developed which is adapted for small quantities of yeast. The wet yeast is prepared by a standardized suction filter method and titrated with Karl-Fischer solution. The dry matter content of yeast cells, harvested at daily intervals from growing cultures, changes in an increasing manner when the cultures becomes older. The values rise from about 20% to more than 30% dry matter from the second to the seventh day respectively.

⁶ R. S. W. THORNE, J. Inst. Brew. 60, 227 (1954).

Spécificité de l'action antiphage de substances synthétiques

Dans un précédent travail¹ concernant le bactériophage de la souche *Escherichia coli* 207, nous avons rapporté qu'un certain nombre de substances possédait une action antiphage «pure», caractérisée par la différence des concentrations efficaces sur les phages et les bactéries. Afin de mettre mieux en évidence cette action antiphage «directe», il nous a semblé intéressant d'étudier comment de telles substances agiraient sur une série de bactériophages d'*Escherichia coli*, la série des types *T* par exemple.

On sait déjà que de tels phages ont un comportement différent, que certains se différencient biochimiquement, qu'on peut les différencier sérologiquement; bref, qu'ils doivent posséder des récepteurs différents. Il devrait être vraisemblable qu'ils réagissent avec différents récepteurs de la cellule.

C'est ce qu'illustre les quelques observations suivantes: KOCH et WEIDEL² démontrent que la protéine (acides aminés) de la membrane d'*Esch. coli* B³ qui joue un rôle

essentiel comme récepteur vis-à-vis des phages T_2 et T_6 ⁴, est qualitativement et quantitativement différente de la protéine de la substance réceptrice du bactériophage T_5 . PUCK et LEE⁵ signalent que T_1 libère moins de constituants macromoléculaires de *Esch. coli* B que T_2 , ce que pensent, d'ailleurs, ZELLE et HOLLÄNDER⁶ pour qui T_2 apparaît une entité plus complexe et différenciée que T_1 . Le mécanisme de la lyse de la souche sensible dépend de la spécificité de l'agent infectant. BROWN⁷ a montré que les mécanismes pour T_3 et $T_{6\alpha}$ apparaissent similaires, mais sont différents de celui induisant la lyse de T_1 .

Nous avons donc entrepris des expériences avec la série des types de T_1 à T_7 correspondant à la même souche sensible *Escherichia coli* de Delbrück, afin d'étudier l'action de certaines de nos substances trouvées actives vis-à-vis du bactériophage correspondant à la souche sensible d'*Escherichia coli* 207. L'action antiphage a été caractérisée par la dose minimum de substance nécessaire pour inhiber la phagolyse des bactéries.

Nous avons employé une méthode des dilutions que nous avons adaptée à nos essais et qui nous permet de lire sur le même support la dose bactériostatique de la souche sensible, la dose phagostatique du phage correspondant ainsi que sa dose «lytique» (quantité maximum de substance permettant encore la lyse des bactéries). A des dilutions croissantes de substance, en bouillon, on ajoute des concentrations déterminées de bactériophage et de sa souche bactérienne sensible. On porte à l'étuve à 37° et on apprécie la constance de la croissance bactérienne, après des temps déterminés, pour une concentration donnée.

Discussion: Les résultats sont suffisamment clairs:

- 1° Les substances expérimentées et toutes actives sur le phage 207, ne sont pas également actives sur tous les phages de T_1 à T_7 .
- 2° Toutes les substances expérimentées sont actives sur T_1 .
- Nous avons naturellement essayé d'obtenir la lyse de la souche *Esch. coli* 207 par T_1 . Cela a toujours été impossible, ainsi que l'inverse, d'ailleurs, c'est-à-dire, la lyse de la souche Delbrück par le bactériophage 207.
- 3° Un certain nombre de ces substances sont actives sur le groupe T_1 , T_3 , T_5 ; pour d'autres, il s'ajoute une action sur T_7 .
- 4° Toutes les substances expérimentées sont inactives sur T_2 , T_4 et T_6 .

T_2 , T_4 , T_6 semblent bien former un groupe à part. DELBRÜCK ne peut pas les distinguer l'un de l'autre morphologiquement en employant le microscope électronique bien qu'ils soient différenciables sérologiquement. Biochimiquement, ils semblent avoir une composition très voisine.

Bien que les acides pentose nucléiques des bactéries aient une composition constante (CHARGAFF⁸), les acides désoxyribonucléiques des phages semblent plus hétérogènes. En effet, WYATT et COHEN⁹, ont mis en évidence que leurs acides nucléiques contiennent de l'hydroxyméthylcytosine (qui remplace la cytosine des bactéries) et que la composition de leurs bases puriques et pyrimi-

⁴ W. WEIDEL, G. KOCH et F. LOHSS, Z. Naturf. 9b, 398 (1954).

⁵ TH. T. PUCK et H. H. LEE, J. exp. Med. 101, 151 (1955).

⁶ M. R. ZELLE et A. HOLLÄNDER, J. Bact. 68, 210 (1954).

⁷ A. BROWN, J. Bact. 71, 482 (1956).

⁸ D. ELSON et E. CHARGAFF, Biochem. biophys. Acta 17, 367 (1955). – E. CHARGAFF, D. ELSON et H. T. SHIGENZA, Nature 178, 682 (1956).

⁹ G. R. WYATT et S. S. COHEN, Biochem. J. 55, 774 (1953).

¹ L. NEIPP, W. KUNZ et R. MEIER, Schweiz. Z. Path. Bakt. 19, 331 (1956).

² G. KOCH et W. WEIDEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 303, 213 (1956).

³ W. WEIDEL, Z. Naturf. 6b, 251 (1951).