

Zusammenfassung.

Es wurde ein neuer Weg zur Bereitung von 17α -Oxy-Steroiden beschrieben. Diese entsprechen in der Konfiguration des Asymmetrie-zentrums 17 bekanntlich den 17-Oxy-Cortico-Steroiden. Die natürlichen Substanzen J und O wurden nach dieser Methodik partial-synthetisch hergestellt.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

291. Untersuchung der Lipidsynthese des Schimmelpilzes *Phycomyces Blakesleeanus* mit Hilfe der Isotopentechnik¹⁾

von Karl Bernhard und Hans Albrecht.

(20. X. 48.)

Mit Hilfe der Isotopen, besonders des schweren Wasserstoffes, konnte gezeigt werden, dass dem Aufbau der Lipide in pflanzlichen und tierischen Zellen Vorgänge zugrunde liegen, welche kleine Molekeln als Bausteine einschliessen. Hinweise über den Verlauf dieser Synthesen sind bereits vorhanden.

Der Deuterium-Gehalt von in Gegenwart von schwerem Wasser gebildeten Fettsäuren lässt das Ausmass stattfindender Fettsynthesen erkennen und erreicht bei Mäusen und Ratten für die gesättigten Fettsäuren 50—60% desjenigen des Körperwassers²⁾. Um im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Tieren von einem völlig fettfreien Milieu, also von vereinfachten Bedingungen auszugehen, haben wir die Fettsynthese beim Schimmelpilz *Phycomyces Blakesleeanus* mit Deuterium als Indicator untersucht und diesen Mikroorganismus, über dessen Fähigkeit zur Lipidbildung wir kürzlich berichteten³⁾, in einer Glucose- und D₂O-haltigen Nährlösung gezüchtet. Letztere wurde in Mengen von je 50 cm³ in Erlenmeyerkolben von 300 cm³ Inhalt verteilt. Nach Sterilisation impften wir mit reifen Sporen. Im ganzen führten wir 5 Züchtungsversuche zu je 40 Kulturen durch. Erfahrungsgemäss kommt das Pilzwachstum unter den gewählten Bedingungen nach etwa 10 Tagen zum Stillstand. Man darf an-

¹⁾ Vorgetragen auf Einladung der *Long Island Biological Association*, Cold Spring Harbor, New York (Symp. on quant. Biol. XIII. Biological Applications of Tracer Elements. 8.—16. Juni 1948).

²⁾ D. Rittenberg und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. **121**, 235 (1937); K. Bernhard und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. **133**, 713 (1940).

³⁾ K. Bernhard und H. Albrecht, Helv. **31**, 977 (1948).

nehmen, dass anschliessend vorerst keine Änderungen im Fettbestand des Mycels eintreten, jedenfalls keine Neubildung mehr erfolgt. Wir haben die Mycele gesammelt und daraus die Lipide gewonnen. Dieselben hydrolysierten wir mit methanolischer Kalilauge, trennten das Unverseifbare ab und isolierten die Gesamt-Fettsäuren (vgl. Tabelle 1). Die Ausbeuten an letzteren ist bei den Versuchen 4 und 5 deshalb etwas niedriger, weil das Pilzwachstum in diesen Fällen bei etwas tieferer Temperatur erfolgte.

Tabelle 1.

Gesamt-Lipide, Fettsäuren und Unverseifbares aus dem Mycel.

Versuch Nr.	Mycel-Gew. total g	Gesamt-Lipide		Fettsäuren		Unverseifbares	
		g	%*)	g	%**)	mg	%**)
1	11,497	2,480	21,5	2,146	86,6	157	6,3
2	11,990	2,683	22,3	2,327	87,0	142	5,3
3	12,269	2,620	21,3	2,206	84,5	152	5,8
4	10,532	2,093	19,8	1,720	82,5	104	5,0
5	9,964	1,777	17,9	1,466	82,7	98	5,5

*) Bezogen auf das Mycelgewicht.

**) Bezogen auf die Gesamt-Lipide.

Aus dem Unverseifbaren gewannen wir durch Fällung mit Digitonin die Sterine. Sie wurden gleich den Gesamt-Fettsäuren auf Deuterium geprüft. Die diesbezüglichen Ergebnisse enthält die Tabelle 2.

Tabelle 2.

Deuterium-Gehalt der Nährlösung, der Gesamt-Fettsäuren und des Ergosterins.

Versuch Nr.	Atom-% Deuterium			D-Werte*) der Fettsäuren und des Ergosterins	
	Nährlösung	Fettsäuren	Ergosterin	Fettsäuren	Ergosterin
1	4,61	2,90	2,59	63	56
2	3,51	2,16	—	62	—
3	2,75	1,64	1,51	60	55
4	1,61	0,99	—	62	—
5	1,41	0,91	—	64	—

*) $\frac{\text{Atom-\% D der Fettsäuren bzw. des Ergosterins}}{\text{Atom-\% D der Nährlösung}} \cdot 100$

Die D-Werte der Gesamt-Fettsäuren betragen rund 62 und zeigen eine für biologische Versuche gute Übereinstimmung. Sie sind für das Ergosterin mit 56 und 55 etwas tiefer.

Es ist denkbar, die Fettsynthese aus Glucose beginne mit der Bildung von Glycerin und Brenztraubensäure und letztere werde zu Acetaldehyd decarboxyliert, aus dem sich durch Kondensation und Oxydoreduktion über Acetaldol, Crotonaldehyd, α , β -Hexylenaldehyd und schliesslich Capronaldehyd aufbauen würden. Durch erneute Anlagerung von Acetaldehyd könnte sich die Reaktion fortsetzen. Ein anderer Weg bestünde in der Bildung von Milchsäure, aus welcher Ameisensäure und Acetaldehyd resultierten. Letzterer würde wieder kondensiert, wobei die Ameisensäure den zur Hydrierung der ungesättigten Aldehyde erforderlichen Wasserstoff lieferte¹⁾.

Nach *Günther* und *Bonhoeffer*²⁾ müssten in beiden Fällen etwa 60% der Wasserstoffatome der gebildeten Fettsäuren im Verlaufe ihrer Synthese aus dem Milieu aufgenommen werden und das Verhältnis D/H (Fett): D/H (Wasser) etwa 0,6 betragen. Wir fanden 0,62, 0,61, 0,59, 0,61 und 0,64. Unsere Versuche führten somit zu Ergebnissen, welche die genannten Vorstellungen über Fettbildung bei Pflanzen durch Aldolkondensation stützen.

Mikroorganismen wie *Clostridium butylicum* oder *Clostridium acetobutylicum* vermögen aus signiertem Acetat Butter- und Capronsäure zu bilden, deren C¹³-Verteilung darauf hinweist, dass sie durch Kondensation der Essigsäure bzw. des C₂-Bruchstückes entstanden sind³⁾. Nach Untersuchungen von *White* und *Werkman*⁴⁾ mit schwerem Kohlenstoff bildet auch die Hefe aus Essigsäure höhere Fettsäuren. Ob ersterer beim Warmblüter dieselbe Rolle als Fettbaustein zukommt, ist noch nicht geklärt, jedenfalls kann Acetat nach *Bloch* und *Rittenberg*⁵⁾ von Ratten sowohl zur Synthese von Cholesterin als von Fettsäuren ausgenutzt werden. Daneben wird aber, wie aus Untersuchungen von *Anker*⁶⁾, *Bloch* und *Kramer*⁷⁾ und *Gurin* und Mitarbeiter⁸⁾ hervorgeht, als Ausgangsmaterial zur Lipidsynthese auch Brenztraubensäure bzw. Milchsäure verwendet.

Es schien uns von Interesse festzustellen, ob Unterschiede im D-Gehalt der einzelnen Fettsäuren des Pilzfettes bestehen. Deutliche Differenzen könnten auf verschiedene Bildungsmechanismen hindeuten. Bei Tieren werden offenbar für die Synthese der einfach

¹⁾ *H. Fink, H. Haehn und W. Hoerbuerger*, Chem. Ztg. **61**, 689 (1937).

²⁾ *G. Günther und K. F. Bonhoeffer*, Z. physik. Ch. **183**, 1 (1939).

³⁾ *H. G. Wood, R. W. Brown und C. H. Werkman*, Arch. Biochem. **6**, 243 (1945).

⁴⁾ *A. G. C. White und C. H. Werkman*, Arch. Biochem. **13**, 27 (1947).

⁵⁾ *K. Bloch und D. Rittenberg*, J. Biol. Chem. **143**, 297 (1942); **145**, 625 (1942); *K. Bloch, E. Borek und D. Rittenberg*, J. Biol. Chem. **162**, 441 (1946); *D. Rittenberg und K. Bloch*, J. Biol. Chem. **154**, 311 (1944); **160**, 417 (1945).

⁶⁾ *H. S. Anker*, Fed. Proc. **7**, 142 (1948).

⁷⁾ *K. Bloch und W. Kramer*, J. Biol. Chem. **173**, 811 (1948).

⁸⁾ *S. Gurin, A. M. Delluva und D. W. Wilson*, J. Biol. Chem. **171**, 101 (1947).

ungesättigten Fettsäuren andere Wege beschritten als für den Aufbau der entsprechenden gesättigten Verbindungen. *Bernhard* und *Bullet* fanden in Versuchen an Ratten für die Ölsäure wesentlich tiefere D-Gehalte als für Palmitin- und Stearinsäure¹⁾.

Bei den geringen erhaltenen Fettsäuremengen war eine Trennung derselben in die einzelnen Komponenten nur nach Vereinigung des Materials aller 5 Versuche durchführbar. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die Fettsäure-Zusammensetzung dieser 5 Gemische eine analoge ist, was wahrscheinlich zutreffen dürfte. Die Aufarbeitung ergab die in der Tabelle 3 genannten Fettsäuren, deren Deuterium-Gehalt wir durch Doppelbestimmungen ermittelten.

Tabelle 3.
Deuterium-Gehalte der Fettsäuren.

	Säure	Atom-% D
C ₁₆	Palmitinsäure	1,72
C ₁₈	Stearinsäure	1,79
	Ölsäure	1,69
	Linolsäure	1,79
	γ -Linolensäure	1,69
	($\Delta^{6:7, 9:10, 12:13}$ -Octadecatriensäure)	
C ₂₂	Behensäure	1,73
C ₂₄	n-Tetracosansäure	1,85
	n-Tetracosensäure	—
	($\Delta^{17:18}$ -Tricosencarbonsäure)	
C ₂₆	n-Hexacosansäure	1,80
	n-Hexacosensäure	1,75

Es folgt somit, dass hinsichtlich der D-Gehalte der im Pilzfett vorkommenden Säuren (wir haben 10 verschiedene Komponenten isoliert und zur Untersuchung gebracht) keine ausgeprägten, ausserhalb der Fehlerquellen liegende Unterschiede bestehen. Ungesättigte und gesättigte Fettsäuren enthalten analoge D-Mengen. Bei unseren Versuchen an Mäusen und Ratten über Lipid-Synthesen aus Kohlehydraten erwiesen sich aus den Körperfetten isolierte Linol- und Linolensäure stets frei von Deuterium. Wir schlossen daraus, diese Tiere vermöchten die genannten Verbindungen nicht aufzubauen²⁾.

Es war zu erwarten, die labilen Wasserstoffatome der Glucose würden in der D₂O-haltigen Nährlösung teilweise gegen Deuterium ausgetauscht. Offenbar stellt sich rasch ein Gleichgewicht ein und

¹⁾ *K. Bernhard* und *F. Bullet*, *Helv.* **26**, 1185 (1943).

²⁾ *K. Bernhard* und *R. Schoenheimer*, *J. Biol. Chem.* **133**, 707 (1940); *K. Bernhard*, *H. Steinhauser* und *F. Bullet*, *Helv.* **25**, 1313 (1942).

der D-Gehalt der Glucose ändert sich während der 10-tägigen Wachstumsperiode nicht (vgl. Tabelle 4). Ein Einbau von an Kohlenstoff gebundenem Deuterium findet nicht statt; die als Pentaacetat isolierte Glucose war praktisch deuteriumfrei.

Tabelle 4.
D-Gehalt der Glucose aus der Nährlösung.

Versuch Nr.	Atom-% D der Glucose	
	vor Pilzwachstum	nach Pilzwachstum
1	1,26	1,25
2	1,22	—
3	1,53	—
4	0,74	0,79

Die Aufnahme von Wasserstoff aus dem Milieu in die sich bildenden Fettsäuren ist nicht nur ein sicherer Beweis für solche synthetischen Vorgänge, sondern ermöglicht auch, ihren zeitlichen Verlauf und ihr Ausmass festzustellen. Der Deuterium-Gehalt der Pilzfettsäuren, welche in einer völlig fettfreien Nährlösung aus Glucose aufgebaut wurden, liefert uns Anhaltspunkte zu einer Formulierung des Reaktionsmechanismus der Fettsynthese. Essigsäure und Brenztraubensäure dürfen als gesicherte Vorläufer der Fettbildung gelten. Das eigentliche reaktionsfähige Zwischenprodukt ist indessen noch nicht bekannt. Auf Grund unserer Ergebnisse möchten wir die Fettbildung bei Mikroorganismen durch Kondensation von Acetaldehyd oder einer reaktionsfähigen Form desselben nicht für unmöglich halten.

Experimenteller Teil.

Wir züchteten den Pilz in einer Nährlösung, die pro Liter 50 g Glucose, 2 g L-Asparagin, 1,5 g prim. Kaliumphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 1 g Hefetrockenextrakt und 40 γ Aneurin enthielt. Dem bidestillierten Wasser fügten wir Deuteriumoxyd zu, das indessen nur in beschränkter Masse zur Verfügung stand, weshalb mehrere Ansätze unter jeweiliger Rückgewinnung des Wassers der Nährlösungen durchgeführt werden mussten. Letzteres wurde durch Destillation mit Kaliumpermanganat gereinigt. Die Nährlösungen erhielten vor dem Pilzwachstum 4,69, 3,55, 2,80, 1,64 und 1,41, und nach dem Wachstum 4,53, 3,47, 2,70, 1,58 und 1,40 Atom-% D.

Die gebildeten Pilzmycele wurden getrocknet. Sie wogen pro 25 cm³ Nährlösung 143,7, 149,9, 153,3, 131,7 und 124,6 mg. Die Raumtemperatur konnte, wie schon erwähnt, leider nicht bei allen Züchtungen einheitlich gehalten werden, worauf das geringere Pilzwachstum bei den Versuchen 4 und 5 zurückzuführen ist. Die Gewinnung der Gesamtlipide, des Unverseifbaren und der Fettsäuren erfolgte wie früher. Auch hinsichtlich der Isolierung der einzelnen Fettsäuren verweisen wir auf unsere kürzlich erschienene Arbeit¹⁾.

¹⁾ K. Bernhard und H. Albrecht, *Helv.* **31**, 977 (1948).

Wir haben 8,5 g der vereinigten Gesamt-Fettsäuren über die Bleisalze in feste und flüssige Anteile getrennt. Letztere wogen 4,395 g (54,9%), ihr D-Gehalt betrug 1,70%, die Jod-Zahl 126,1. 3,90 g dieser flüssigen Säuren lieferten bei der Bromierung 581 mg bei 195° schmelzendes Hexabromid der γ -Linolensäure oder $\Delta^{6:7, 9:10, 12:13}$ -Octadecatriensäure, enthaltend 63,02% Br ($C_{18}H_{30}O_2Br_6$, ber. 63,28%) und 612 mg Tetrabromid der cis-cis-Linolsäure (Smp. 112—113°, Br-Gehalt, gef. 53,15, ber. $C_{18}H_{32}O_2Br_4$ 53,31%). Durch Abkühlen der Petrolätherlösung auf tiefe Temperaturen erhielten wir schliesslich das Dibromid der Ölsäure.

$C_{18}H_{34}O_2Br_2$	Ber. Br 36,16%	Äq.-Gew. 442,1
	Gef. „ 37,07%	„ 443,9, 445,5

Die festen Säuren (D-Gehalt 1,77 Atom-% D) wurden methyliert und 3,48 g Methyl-ester bei 0,07—0,08 mm Hg fraktioniert destilliert. Wir erhielten in 10 Fraktionen 3,24 g Ester; zurück blieben 184 mg braune, feste Masse. Einige der Fraktionen mussten nochmals destilliert werden. Die Abtrennung der höheren ungesättigten Säuren erfolgte über die Magnesiumsalze.

Wir erhielten:

- 910 mg Palmitinsäure, Smp. 63°, Misch-Smp. mit Palmitinsäure 63—64°, Äq.-Gew. ber. 256,3, gef. 255,5.
- 92 mg Stearinsäure, Smp. 67,5—68°, Misch-Smp. mit Stearinsäure 68°, Äq.-Gew. ber. 284,3, gef. 281,0.
- 101 mg Behensäure, Smp. 78—79°, Misch-Smp. mit Behensäure 79°, Äq.-Gew. ber. 340,4, gef. 338,0.
- 200 mg Tricosan-carbonsäure (Lignocerinsäure), Smp. 80—81°, Äq.-Gew. ber. 368,4, gef. 365,0.
- 103 mg $\Delta^{17:18}$ -Tricosen-carbonsäure (Tetracosensäure), Smp. 36—37°, Äq.-Gew. ber. 366,4, gef. 364,0.
- 110 mg Pentacosan-carbonsäure (Cerotinsäure), Smp. 77—78°, Äq.-Gew. ber. 396,4, gef. 391,8.
- 218 mg Pentacosen-carbonsäure (Hexacosensäure), Smp. 44°, Äq.-Gew. ber. 394,4, gef. 392,5.

Die Deuterium-Bestimmungen aller Fraktionen führten wir im Doppel durch, wobei einige Proben aus Materialmangel mit Stearinsäure verdünnt werden mussten. Die Bromide haben wir zusammen mit Silberoxydpulver verbrannt.

Zu den D-Bestimmungen in der Glucose verwendeten wir einerseits den durch Abdampfen des Wassers und völliges Trocknen verbleibenden Rückstand der Nährlösung, andererseits das nach den Angaben von Stetten und Bozer¹⁾ erhaltene Glucose-pentaacetat.

Zusammenfassung.

1. Die Anwendung von Deuterium als Indicator erlaubt uns, die Aufnahme von Wasserstoff in im Verlaufe der biologischen Lipidbildung entstehende Fettsäuren und Sterine zu verfolgen und damit Einblicke in den Mechanismus solcher Synthesen zu erlangen.

2. Wir züchteten den Schimmelpilz *Phycomyces Blakesleeanus* in einer Glucose-haltigen Nährlösung, welcher wir etwas schweres Wasser zufügten, sammelten nach beendetem Wachstum die Mycele und isolierten daraus das Ergosterin und die Fettsäuren. Letztere wiesen bei 5 Versuchen Deuterium-Gehalte auf, die 63, 62, 60, 62 und 64% derjenigen der jeweiligen Nährlösungen ausmachten. Für das Ergosterin waren sie etwas tiefer.

¹⁾ D. Stetten, Jr. und G. E. Bozer, J. Biol. Chem. **156**, 271 (1944).

3. Diese Werte stimmen gut mit der berechneten Wasserstoffmenge überein, welche aus dem Milieu in die entstehenden Fettsäuren eintreten müsste, wenn ihr Aufbau aus Acetaldehyd über Acetaldol, Crotonaldehyd usw. durch Kondensation und Oxydoreduktion erfolgen würde. Unsere Versuche haben somit zu Ergebnissen geführt, welche die genannten Vorstellungen über die Fettsäuresynthese in vivo stützen.

4. Die Deuterium-Gehalte der einzelnen Fettsäuren, die wir aus dem Gemisch der Gesamt-Fettsäuren isolierten (Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol-, γ -Linolen, Behen-, Tetracosan-, Tetracosen-, Hexacosan- und Hexacosensäure), zeigten keine betonten Unterschiede; gesättigte und ungesättigte Säuren enthielten im Gegensatz zu den Befunden bei Tieren gleich viel schweren Wasserstoff, woraus man schliessen dürfte, dass ihrer Entstehung einheitliche Vorgänge zugrunde liegen.

5. In die Glucosemoleküle der D_2O -haltigen Nährlösung tritt während des Pilzwachstums kein an Kohlenstoff gebundener schwerer Wasserstoff ein.

Wir verdanken bestens eine von der Isotopen-Kommission der Schweizerischen Akademie der medizinischen Wissenschaften für diese Arbeit erhaltene finanzielle Unterstützung.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

292. Recherches sur les équilibres de dissociation des sulfates de calcium, de potassium et de sodium, seuls ou en présence d'adjuvants

par E. Briner, G. Pamm et H. Paillard.

(20 X 48)

La dissociation du sulfate de calcium a déjà fait l'objet de nombreux travaux en raison de l'intérêt technique qu'elle présente pour la production du gaz sulfureux. Les résultats expérimentaux obtenus — nous en citerons quelques-uns plus loin — se rapportent, soit à l'équilibre de dissociation, soit à la vitesse de dissociation. Dans notre travail, nous nous sommes proposés de reprendre l'étude expérimentale de ce problème, en faisant porter nos recherches également sur la dissociation de deux autres sulfates, les sulfates de potassium et de sodium, qui ont été beaucoup moins étudiés que le sulfate de calcium. De plus, nous avons appliqué à ces diverses réactions les formules de la thermodynamique chimique, en nous aidant des données énergétiques dont nous pouvions disposer; les résultats de ces calculs