

Für die Ausbildung der verschiedenen Öltypen muß die Adsorption eine große Rolle spielen, die man bisher weit unterschätzt hat. Die einzelnen Verbindungsreihen: Aliphaten, Naphthene, Aromaten, hochmolekulare Stoffe unterscheiden sich sehr im adsorptiven Verhalten, u. zw. nimmt die Adsorbierbarkeit in der aufgeführten Reihenfolge zu. Schon der Sammlungsprozeß der Öle in den produktiven Horizonten muß mit adsorptiver Trennung in Fraktionen verbunden sein, wobei gelöstem Erdgas, in der Hauptsache Methan, große Bedeutung zukommen muß. Nur so ist das benachbarte Vorkommen recht verschieden zusammengesetzter Öle erklärbar, etwa Überlagerung paraffinbasischer und naphthenbasischer Öle auf kurze Entfernung im gleichen Lager. Bisher war man zur Annahme gegenseitiger Umwandlungen gezwungen, die chemisch undenkbar sind.

Der geforderte biologische Primärprozeß der eigentlichen Ölbildung ist in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen. Im Tiefseeschlamm des Schwarzen Meeres hat man Kohlenwasserstoff in Mengen von 10 % der organischen Substanz gefunden⁵). Russische Forscher, vor allem *Arhangelski*, vertraten auf Grund derartiger Befunde die biochemische

Entstehung des Erdöls⁶). Die Versuche von *Terras*⁷) über anaeroben bakteriellen Celluloseabbau, der unter Fettsäurebildung verläuft, bestätigen die Möglichkeit. Die Tatsache, daß die Erdölbildung sich im Sediment am Meeresboden abspielt, erklärt es, daß die Stätte des biochemischen Primärprozesses unzugänglich ist. Der Hauptvorteil der biologischen Theorie besteht in der Möglichkeit, die Umwandlung annähernd der Gesamtsubstanz der Sedimente in Öl zwanglos annehmen zu dürfen.

Aber auch auf die Bildung der Ölschiefer, die der Menge nach die Erdöle übertreffen, läßt sie sich ohne weiteres anwenden. Das Bitumen der Ölschiefer weist auch einen ziemlich hohen Reduktionsgrad, d. h. viel H, wenig O auf. Da genaue systematische Analysen der Ölschiefer vollkommen fehlen, nur die Öle der destruktiven Destillation sind genau bekannt, ist dieses Problem einer eingehenden theoretischen Behandlung noch nicht zugänglich. Erklärungen durch anders geartete Reduktionsprozesse müssen jedoch völlig versagen, da das Bitumen sich mit Sicherheit auf primärer Lagerstätte befindet, so daß viele beim Erdöl immerhin diskutierbare Möglichkeiten entfallen. Darin liegt ein zwingender Beweis für die biologische Natur der Reduktionsvorgänge.

Eingeg. 28. März 1940. [A. 43.]

⁵) *Ginsburg-Karagitschewa, Rodionova*, Beitrag zur Kenntnis der im Tiefseeschlamm stattfindenden biochemischen Prozesse. Zur Frage der Erdölbildung, *Biochem. Z.* **275**, 390 [1935].

⁶) Siehe dazu: Erdölmuttersubstanz. Schriften aus dem Gebiet der Brennstoff-Geologie. Herausgeg. von *O. Stutzer*, Heft 10 [1935], *D. Wolansky*, S. 175.

⁷) Diese Ztschr. **48**, 160 [1935].

Nährstoffe und Wuchsstoffe der Milchsäurebakterien

Von Dr. E. F. Möller

Pharmakologisches Institut
der Universität u. Institut für Biologie
am Kaiser-Wilhelm-Institut für
medizinische Forschung, Heidelberg

Inhalt: I. Nährsalze. — II. Kohlenhydrate. — III. Wuchsstoffe. 1. Lactoflavin. 2. Pantothenensäure. 3. Adermin. 4. Faktor „G“. 5. Komplex „H“. 6. Aneurin. 7. Ascorbinsäure. — IV. Aminosäuren. — V. Über die Unstimmigkeiten zwischen den Ergebnissen verschiedener Autoren. — VI. Hemmstoffe. — VII. Die praktische Bedeutung der Untersuchungen über die Ernährungsverhältnisse der Milchsäurebakterien.

I. Nährsalze.

Wie alle Lebewesen, benötigen die Milchsäurebakterien eine Reihe anorganischer Salze. Bei den autotrophen Lebewesen, die in Salzlösung allein gedeihen können, ist das Bedürfnis an Salzen nach zahlreichen Untersuchungen qualitativ und quantitativ stark wechselnd von Art zu Art, ja von Stamm zu Stamm. Bei heterotrophen Organismen, zu denen die Milchsäurebakterien gehören, stößt die Erforschung natürlich auf große Schwierigkeiten und kann nur Schritt für Schritt mit der Erkenntnis der übrigen Nähr- und Wuchsstoffe weitergeführt werden. Es ist so nicht verwunderlich, daß bei den Milchsäurebakterien in dieser Hinsicht bisher nur wenige Befunde gesichert sind. Praktisch bewährt haben sich die in Tab. 1 angegebenen Salzlösungen. Auffallend ist, daß diese kein Ca⁺⁺ enthalten. Es steht noch nicht fest, ob alle Ionen unbedingt erforderlich und wie groß ihre optimalen Konzentrationen sind. Lediglich für Mn⁺⁺ konnte ich zeigen, daß es in Glucose-Bouillon, die praktisch Mn⁺⁺-frei ist, unbedingt benötigt wird und bei einer Konzentration von $\sim 0,65 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ optimal wirkt. Ein Ersatz des Na-Acetats durch Phosphat- oder gar Citrat- und Glykokoll-Puffer hat sich nach eigenen unveröffentlichten Versuchen als ungünstig erwiesen. *Orla-Jensen*¹) hat das optimale Anfangs-pH für alle Arten festgelegt.

Tabelle 1.

Salzlösungen zur Züchtung von Milchsäurebakterien.

Nach Möller ²) (spez. für <i>Sbm. plantarum</i>)	Nach Snell ³) (spez. für <i>Sbm. casei</i>)
OH ₄ COONa $13,75 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³	OH ₄ COONa $6,0 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O $1,25 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³	K ₂ HPO ₄ $0,5 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³
KH ₂ PO ₄ $0,88 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³	KH ₂ PO ₄ $0,5 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³
MgSO ₄ · 7H ₂ O $0,42 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³	MgSO ₄ · 7H ₂ O $0,2 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³
FeSO ₄ · 7H ₂ O $2,5 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³	FeSO ₄ · 7H ₂ O $1,0 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³
MnCl ₂ · 4H ₂ O $1,25 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³	MnSO ₄ · 3H ₂ O $1,0 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³
(NH ₄) ₂ SO ₄ $5,0 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³	NaCl $1,0 \cdot 10^{-3}$ g/cm ³

II. Kohlenhydrate.

Ohne die Anwesenheit eines vergärbaren Kohlenhydrats ist das Wachstum der Milchsäurebakterien unmöglich. Über die Vergärbarkeit von Kohlenhydraten durch Milchsäure-

bakterien liegt eine ausgedehnte Literatur vor, besonders von bakteriologischer Seite; denn die Verschiedenheit des Gärvermögens ist ja gerade eines der differential-diagnostischen Mittel zur Unterscheidung der verschiedenen Arten. Es sei hier nur auf die grundlegenden Arbeiten von *Orla-Jensen*¹) verwiesen, denen auch die Tab. 2 entnommen ist. Darin wird die Vergärbarkeit der wichtigsten Kohlenhydrate, und zwar durch die Streptobakterien, gezeigt, da hauptsächlich mit dieser Gattung die neueren Wuchsstoffarbeiten bei den Milchsäurebakterien durchgeführt worden sind. Es darf nicht unerwähnt bleiben, daß die Vergärbarkeit von Kohlenhydraten und anderen C-Quellen keine absolute Eigenschaft der Bakterien ist, sondern daß sie 1. von Stamm zu Stamm wechselt — obwohl von gewissen Stämmen bestimmte C-Quellen bevorzugt vergoren werden —, 2. von den übrigen Ernährungsbedingungen, besonders von der (sogenannten) N-Quelle, abhängig ist. Deshalb sind in Tab. 2 sowohl die Stämme als auch die Nährmedien genau angegeben.

Tabelle 2.

Vergärbarkeit von Kohlenhydraten durch Milchsäurebakterien.
[Nach *Orla-Jensen*¹).]

Kohlenhydrate u. ähnl. C-Quellen	Sbm. plantarum		Sbm. casei		
	Stamm 24		Stamm 11		
	Witte-Pepton	Caseinpepton	Witte-Pepton	Caseinpepton	Hefe
Glycerin	0,1 ^{*)}	0,5	0,2	0,8	0,7
Xylose	2,5	15,1	0	0	0
Arabinose	2,8	8,3	0,5/0	0	0
Rhamnose	0,1	0,2	0	0	0
Sorbit	0	0,2	0	0	0
Mannit	0,7	2,9	1,1	2,5	7,1
Fructose	2,6	8,9	5,2	11,7	15,8
Glucose	1,9	7,8	6,8	13,7	15,1
Mannose	1,1	6,9	5,4	13,5	14,6
Galaktose	1,0	5,6	3,6	12,2	12,8
Saccharose	2,2	6,2	0,2	10,1/2,5	0,2
Maltose	6,5	7,4	1,1	12,4	0,7
Lactose	1,8	6,5	5,0	12,5	15,3
Raffinose	0,1	6,4	0	0	0
Inulin	0	0	0	0	0
Dextrin	1,1	1,9	0	0,2	0
Stärke	0	0	0	0	0
Solein	2,3	5,1	10,8	12,8	12,8

^{*)} Die Zahlen bedeuten die Zunahme der titrierbaren Säuren, ausgedrückt in % Milchsäure.

¹) The lactic acid bacteria, Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skrifter, Naturv. og Mathematisk Afd. **8**, V, 2 [1919].

²) Unveröffentlicht. Bism. andere, in früheren Untersuchungen verwendete Salzlösung ist von *E. F. Möller*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **200**, 246 [1933] angegeben.

³) *E. E. Snell, F. M. Strong u. W. H. Peterson*, Biochemical J. **31**, 1789 [1937].

Orla-Jensen⁴⁾ hat einen interessanten Effekt gefunden und ihn „Aktivierung der Kohlenhydrate“ genannt. Sterilisiert man Kohlenhydrate zusammen mit natürlichen Stickstoffquellen, wie Eiweißstoffen (Peptonen) oder besser Hefautolysat, so ist das Wachstum vieler Milchsäurebakterien weit stärker als in Nährböden, bei denen diese Komponenten vorher einzeln sterilisiert werden. An Stelle von Kohlenhydraten wirken auch ihre Spalt- und Umwandlungsprodukte, wie Methylglyoxal, Diacetyl, Furfurol. Eine besondere Rolle scheint Xylose zu spielen. Es ist ferner sehr bedeutsam, daß durch Erhitzen des Nährbodens zusammen mit Methylglyoxal vorher nicht oder nur schwer vergärbare Kohlenhydrate leicht vergärbbar werden. Die Bildung dieser unbekannten wachstumsfördernden Substanzen wird durch Leitungswasser begünstigt, was auf die katalytische Wirksamkeit von Metallsulfiden hindeutet. Orla-Jensen nahm an, daß unter den vorliegenden Bedingungen „cozymase-ähnliche“ Stoffe gebildet werden.

Einen ähnlichen Effekt fanden Nielsen u. Hartelius⁵⁾ für *Aspergillus niger*. Werden Glucose, Fructose oder Arabinose mit organischen Säuren, wie Oxalsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, Citronensäure oder besser deren Ammoniumsalzen in Anwesenheit von Filtrierpapier (bzw. dessen Asche) auf 135° unter Druck erhitzt, so bilden sich wachstumsfördernde Substanzen. Da diese auch ohne die Anwesenheit von Stickstoffkomponenten entstehen, nehmen Nielsen u. Hartelius an, daß sie stickstofffrei und deshalb mit den eben genannten Wirkstoffen von Orla-Jensen⁴⁾ nicht identisch sind.

Versuche, die chemische Natur dieser Stoffe zu ergründen, sind noch gar nicht unternommen worden; es ist möglich, daß sich hierbei noch interessante Ergebnisse zeigen werden.

III. Wachstumsstoffe.

Der erste Nachweis, daß Milchsäurebakterien vitaminartige Stoffe benötigen, geht auf J. G. Davis u. Mitarb. (1929) zurück. Davis u. Mattick⁶⁾ konnten zeigen, daß ein Milchsäurebakterienstamm aus roten Flecken von Cheddar-Käse außer Kohlenhydraten und Eiweißstoffen zur Vermehrung einen zusätzlichen Faktor benötigt. Dieser war z. B. in Vitamin-B₁-Konzentraten enthalten. Es ergab sich aber bald (Davis u. Golding⁷⁾), daß die aktive Substanz nicht mit Vitamin B₁ identisch sein konnte. Weitere, auch auf viele andere Milchsäurebakterien ausgedehnte Untersuchungen von Davis u. Mitarb.⁸⁾, von Rahn u. Mitarb.⁹⁾, von Koser u. Saunders¹⁰⁾, von Eagles¹¹⁾ u. a. enthalten zwar viele interessante Einzelbefunde, sie haben sich aber nicht über einen orientierenden Charakter erhoben.

1. Lactoflavin.

Eingehender hat sich Orla-Jensen¹²⁾ (1933—1936) in einer Reihe von Arbeiten mit der Ernährung sehr vieler Milchsäurebakterien, u. zw. zunächst solcher, die in Milch gedeihen, beschäftigt. Es ist sein unumstrittenes Verdienst, den ersten Wachstumsstoff für viele Milchsäurebakterien in Lactoflavin, dem von R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg¹³⁾ entdeckten Vitamin B₂, dessen Phosphorsäureester bekanntlich die Wirkgruppe des gelben Fermentes von O. Warburg¹⁴⁾ ist, gefunden zu haben. Die optimal wirkende Konzentration betrug bei den Langstäbchen rd. $0,5 \cdot 10^{-6}$ g/cm³, was gerade dem durchschnittlichen Gehalt der Milch (0,5—1,0 mg/l) entspricht. Das Bedürfnis der Kokken war „noch niedriger“. Orla-Jensen hat auf folgendem Wege die Nötigkeit von Vitamin B₂ gefunden: Aus Milch wurde mit Kohle (Norit) ein Teil der Wachstumsstoffe adsorbiert. Das Eluat wurde durch Kochen mit Alkali inaktiviert. Durch Zusatz von Lactoflavin wurde das inaktivierte Eluat wieder wirksam. Da das ebenfalls alkalilabile Vitamin B₁ keinen Effekt zeigte, ergab sich, daß letzteres bei den untersuchten Stämmen als Wachstumsstoff keine Rolle

spielt. Im alkalistabilen Teil des Eluats vermutete Orla-Jensen eine Bios-Substanz (Pantothensäure) oder auch Vitamin B₆. Nach unseren heutigen Kenntnissen kann es sich weder um Pantothensäure gehandelt haben, die äußerst empfindlich gegen Alkali ist, noch um Vitamin B₆, das sich (nach eigenen unveröffentlichten Versuchen) aus Milch und Molke nur schlecht an Kohle adsorbieren läßt. Einen weiteren für viele Milchsäurebakterien nötigen Wachstumsstoff konnte Orla-Jensen schließlich in der Lactosefraktion der Milch nachweisen.

Wood, Anderson u. Werkman¹⁵⁾ fanden, daß das Wachstum von *Lactobacillus manitopoeus*, *L. lyocopersici*, *Sc. paracitrovorus* in hydrolysiertem Casein durch Zugabe von Lactoflavin gefördert, daß aber das an sich kräftige Wachstum von *L. pentoaceticus* unter den gleichen Bedingungen von Lactoflavin nicht beeinflusst wird. In einem verbesserten Medium konnten die Autoren¹⁶⁾ später feststellen, daß bei gewissen Stämmen von Propionsäurebakterien — bei anderen wiederum nicht — eine Züchtung in fortlaufenden Passagen nur in Gegenwart von Lactoflavin gelingt. Dabei machten sie gleichzeitig die Entdeckung, daß die Zugabe bestimmter Aminosäuren die Anwesenheit von Lactoflavin überflüssig macht. Dieser bisher noch nicht von anderer Seite bestätigte Befund ist gewiß von sehr großem Interesse, da er darauf hindeutet, daß diese Aminosäuren Bausteine derjenigen Fermente sind, welche die Bakterien befähigen, das von ihnen benötigte Lactoflavin selbst zu synthetisieren.

Snell u. Strong¹⁷⁾ untersuchten in einem weitgehend gereinigten, völlig flavinfreien System 11 Arten von Milchsäurebakterien auf ihren Bedarf an Lactoflavin bei Züchtung in fortlaufenden Passagen. Nur *B. delbrückii*, *L. gayoni*, *Sbm. casei* und *B. lactis acidii* waren auf Lactoflavin angewiesen, während *L. arabinosus*, *L. pentosis*, *B. brassicae*, *L. pentoaceticus*, *L. manitopoeus*, *Leuconostoc mesenteroides* und *Sc. lactis* selbst nach 5 Passagen mit und ohne Lactoflavin gleich gut wuchsen. Für vier dieser letzteren wurde außerdem noch bewiesen, daß sie Lactoflavin selbst synthetisieren (Lumiflavinbestimmung). Die optimale Konzentration betrug für alle Stämme $\sim 0,5 \cdot 10^{-7}$ g/cm³. Bei *Sbm. plantarum* (10 Stämme) scheint Lactoflavin nach eigenen Untersuchungen ebenfalls unnötig zu sein. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu denen Orla-Jensens¹²⁾, der angab, daß Lactoflavin für alle wahren Milchsäurebakterien notwendig sei. Orla-Jensen arbeitete aber in einem anderen Medium als Snell u. Strong.

Tabelle 3.
Spezifität von Flavinen bei Milchsäurebakterien, bei der Ratte und im Flavinenzymtest.

[Nach Snell u. Strong¹⁷⁾, ergänzt nach Kuhn¹⁸⁾].

Flavinderivat	Sbm. casei		B. lactis acidii		Ratte Wachstum	Flavin-enzymtest
	Säuerung ^{a)}	Konz. ^{a)} 10 ⁻⁷ g/cm ³	Säuerung ^{a)}	Konz. ^{a)} 10 ⁻⁷ g/cm ³		
6,7-Dimethyl-d-riboflavin (Lactoflavin)	+++	0,5	+++	0,5	+++	+++
6-Methyl-d-riboflavin	+	3	+	0,5	+++	+++
7-Methyl-d-riboflavin	++	1	++	1	+++	+++
6-Äthyl-7-methyl-d-riboflavin	++ (+)	0,5	++	1	+++	+
6,7-Dimethyl-d-araboflavin (++)	○	10	○	10	++	○
6,7-Dimethyl-l-araboflavin (++)	○	10	(+)	10	+	+++
6-Äthyl-7-methyl-l-araboflavin (++)	○	10	○	10	○	○
6,7-Dimethyl-d-glucosylflavin	○	10	○	10	○	○
5,6-Riboflavin	○	10	○	10	○	○
5,6-Benzoriboflavin (++)	○	10	○	10	○	○
6,7,9-Trimethyliso-alkoxazin (Lumiflavin)	○	300	○	300	○	○
6,7-Dimethylalkoxazin (Lumichrom)	○	300	○	300	○	○
Lactoflavin-tetraacetat	○	1	○	1	+++	○

^{a)} Bei den Bakterientesten bedeutet die Zahl der Kreuze ein ungefähres Maß des Wachstums (gemessen durch direkt titrierbare Säure), die Zahlen geben bei den aktiven Präparaten die optimale, bei den inaktiven die höchst angewandte Konzentration (in 10^{-7} g/cm³) an. ○ heißt inaktiv.

^{b)} R. Kuhn, diese Ztschr. 40, 6 [1936].

^{c)} H. v. Euler, P. Karrer u. M. Malmberg, Helv. chim. Acta 18, 1336 [1936], ferner P. Karrer u. Th. Quibell, ebenda 19, 1084 [1936].

^{d)} In einem besonderen Test, der in Gegenwart eben ausprechender Lactoflavin-Konzentration arbeitet, konnte von Snell u. Strong¹⁷⁾ auch eine gewisse Wirksamkeit von 6,7-Dimethyl-araboflavin, u. zw. sowohl der d- als auch der l-Form, ferner von 6-Äthyl-7-methyl-l-araboflavin und von 5,6-Benzoriboflavin, teilweise im Gegensatz zu den Tierversuchen, festgestellt werden.

^{e)} Proc. Soc. exp. Biol. Med. 36, 217 [1937].

^{f)} J. Bacteriol. 34, 132 [1937].

^{g)} Enzymologica 6, 186 [1939]; vgl. J. biol. Chemistry 123, Proc. CXII [1938].

^{h)} R. Kuhn, diese Ztschr. 40, 6 [1936].

⁴⁾ J. Soc. chem. Ind., Chem. & Ind. 52, Trans. 374 [1933]. ⁵⁾ Biochem. Z. 256, 2 [1932].

⁶⁾ J. Dairy Res. 1, 50 [1929]; 2, 136 [1930]. ⁷⁾ Biochemical J. 24, 1503 [1930].

⁸⁾ J. G. Davis u. A. T. R. Mattick, J. Dairy Res. 4, 81 [1932]; J. G. Davis, ebenda 10, 186 [1933].

⁹⁾ O. Rahn u. C. P. Hegarty, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 38, 218 [1933]; O. Rahn, C. P. Hegarty u. R. E. Deuel, J. Bacteriol. 35, 547 [1938]. ¹⁰⁾ Bact. Rev. 2, 99 [1933].

¹¹⁾ B. A. Eagles, O. Okultsch u. A. St. Kadislaw, Canad. J. Res. 16 B, 46 [1938].

¹²⁾ S. Orla-Jensen, N. C. Otte u. A. Snog-Kjaer, Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skrifte, Naturv. og Math. Afd. 9, VI, 5 [1936]; vgl. a. Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. II 94, 494 [1936]; ferner Nature 125, 915 [1935].

¹³⁾ R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 317 [1933].

¹⁴⁾ O. Warburg u. W. Christian, Naturwiss. 20, 688, 980 [1932]; Biochem. Z. 254, 438 [1932]; 257, 492 [1933]; 266, 377 [1933].

Es besteht die Möglichkeit, daß die Ab- oder Anwesenheit bestimmter Substanzen die Ansprechbarkeit auf Flavin völlig verändert — ich erinnere in diesem Zusammenhang an die Befunde von Wood, Anderson u. Werkmann¹⁵⁾ über die Verethbarkeit von Lactoflavin durch gewisse Aminosäuren.

Sehr interessant sind schließlich die Versuche von Snell u. Strong¹⁷⁾ mit verschiedenen Flavinen. Tab. 3 enthält Vergleiche zwischen dem Bakterientest, dem Test an der Ratte und dem Warburgschen Fermentversuch. Die Übereinstimmung der drei Tests in der Mehrzahl der Fälle zeigt die hohe Spezifität des Lactoflavins auch für die Milchsäurebakterien. Die Inaktivität des Lactoflavintetraacetats bei den Milchsäurebakterien im Gegensatz zur Aktivität an der Ratte muß auf die schwere Spaltbarkeit esterartiger Verbindungen durch die verwandten Milchsäurebakterien zurückgeführt werden. Der Mangel an gewissen esterspaltenden Fermenten scheint eine allgemeine Eigenschaft vieler Milchsäurebakterien zu sein. So ist z. B. nach Snell u. Strong¹⁷⁾ sowohl Pantothenäuremethylester als auch acetylierte Pantothenäure bei Sbm. casei unwirksam, nach eigenen Versuchen wirkt Biotinmethylester — wie später noch näher ausgeführt wird — bei Sbm. plantarum erst in viel höherer Konzentration als freies Biotin, und nach unveröffentlichten Versuchen kann Glutaminsäure durch Glutathion erst in viel höherer Dosierung, durch N-Acetylglutaminsäure überhaupt nicht ersetzt werden.

Bisher ist Lactoflavin nur bei wenigen anderen Mikroorganismen als Wuchsstoff bekanntgeworden. Mosher, Saunders, Kingery u. Williams¹⁹⁾ zeigten, daß es bei dem pathogenen Schimmelpilz *Trichophyton interdigitale* (= *Oospora tonsurans*) wirksam ist. Sartory, Sartory u. Meyer²⁰⁾ fanden einen günstigen Einfluß auf das Wachstum gewisser Sarzinen, und Hutchings u. Woolley²¹⁾ erwiesen kürzlich seine Notwendigkeit bei einem Stamm eines hämolytischen Streptokokkus. Auch auf einige Arten der Schimmelpilze *Phycomyces*, *Mucor* und *Absidia* wirkt Lactoflavin wachstumsfördernd²²⁾.

2. Pantothenäure.

Einen weiteren Einblick in das Wuchsstoffsystem der Milchsäurebakterien verdanken wir Peterson u. Mitarb. Nach einigen orientierenden Arbeiten²³⁾, die sich auch mit der Ernährung der Propionsäurebakterien beschäftigten, erkannten Snell, Strong u. Peterson³⁾, daß für das Wachstum von 13 verschiedenen Milchsäurebakterienarten eine ätherlösliche, säure- und alkaliempfindliche Säure von niederem Molekulargewicht unbedingt erforderlich ist. Zur Anreicherung dieses Faktors, dessen Notwendigkeit also viel verbreiteter ist als die des Lactoflavins, wurde ein Grundmedium entwickelt, das neben den in Tab. 1 angegebenen Salzen enthält:

Glucose	1,0%
Peptonhydrolysat	0,5%
Cystin	0,01%
Tryptophan	0,01%
Lactoflavin	0,1 mg%

Als Standardstamm diente zuerst *B. delbrücki*, später *Sbm. casei*. Da die titrierbare Säuerung eine Funktion des Wachstums ist, wurde die Wuchsstoffaktivität auf diesem einfachen Wege gemessen, was übrigens auch schon Orla-Jensen¹²⁾ getan hatte.

Der neue Faktor, der aus Leber gewonnen wurde, ließ sich nicht ersetzen durch: Auxin a, Pimelinsäure, β -Indolyl-essigsäure, Nicotinsäure, Aneurin, Aneurin + Nicotinsäure, Uracil, Brenztraubensäure, Substanzen, deren Wuchsstoffcharakter bei anderen Mikroorganismen erwiesen war.

Snell, Strong u. Peterson²⁴⁾ konnten es sehr wahrscheinlich machen, daß der Faktor mit der Pantothenäure von Williams²⁵⁾ identisch ist. 80%ige Pantothenäurepräparate von Williams²⁶⁾ zeigten eine optimale Wirksamkeit in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ g/cm³ bei *Sbm. casei* und in ähnlichen Konzentrationen bei anderen Milch- und Propionsäurebakterien.

Pantothenäure war bis dahin nur als Wuchsstoff für bestimmte Hefen^{26, 27)} und einen pathogenen Schimmelpilz¹⁹⁾ durch Williams u. Mitarb. bekanntgeworden. In der Folgezeit wurde sie aber außer bei Milch- und Propionsäurebakterien auch noch für das Wachstum verschiedener pathogener Streptokokken (Hutchings u. Woolley²¹⁾, Subbarow u. Rane²⁸⁾) und von Diphtheriebazillen (J. H. Mueller²⁹⁾) als nötig erkannt. Inzwischen gelang es Williams u. Mitarb.³⁰⁾, die Natur der Pantothenäure näher aufzuklären: Die Inaktivierung in Säuren oder Laugen führt nämlich zur Abspaltung von β -Alanin, das sich interessanterweise schon früher — allerdings erst in höherer Konzentration — als Wuchsstoff für bestimmte Hefen (Williams u. Rohrmann³¹⁾) und später auch für Diphtheriebazillen (Mueller u. Cohen³²⁾) zeigte. Das zweite Spaltstück der Pantothenäure kann nach der Summenformel eine Dioxylvaleriansäure sein. Für diese Möglichkeit spricht die Wirksamkeit von α , δ -Dioxyvaleriansäure an Stelle von Pantothenäure bei einem bestimmten Stamm von Streptococcus zymogenes (Woolley³³⁾). Jedoch ist auch α , ϵ -Dioxycapronsäure bei einem ähnlichen Stamm wirksam (Hutchings u. Woolley²¹⁾). Bei den Milchsäurebakterien ist allerdings bisher noch keine Wirkung der beiden Komponenten — sei es einzeln oder zusammen — beschrieben worden. Von größtem Interesse ist schließlich, daß die Pantothenäure mit dem Rattenfiltratfaktor und dem Hühnerantidermatitisfaktor, also mit einem Vitamin der B-Gruppe, identisch zu sein scheint³⁴⁾.

3. Adermin.

Seit 1936 habe auch ich mich im Rahmen der Arbeiten über die biologischen Vorgänge bei der Silage (Eichholtz³⁵⁾, Keil³⁶⁾, Möller³⁷⁾) mit den Ernährungsverhältnissen der Milchsäurebakterien beschäftigt. Es lag deshalb in der Natur der Sache, daß ich zu meinen Untersuchungen hauptsächlich *B. acetylcholini* (Keil³⁶⁾) = *Streptobacterium plantarum* (Orla-Jensen) verwandte. Dieses Milchsäurebakterium, das die letzten Stufen der Säuerung in gut verlaufenden Silagen beherrscht, ist nach Orla-Jensen¹⁾ der nächste Verwandte des von den amerikanischen Forschern benutzten *Sbm. casei* und unterscheidet sich unter anderem von letzterem durch die pharmakologisch höchst interessante Eigenschaft, in geeigneten Nährböden Acetylcholin zu bilden.

Andere von mir untersuchte Stämme sind: *Sbm. plantarum* (Nr. 24 von Orla-Jensen), *B. acetylcholini* (8—19 Stämme), *B. cucumeris fermentati* (Henneberg), *B. utile* (Henneberg), *B. lactis acidii* (Leichmann), *Bc. arabinosaceus* (von Orla-Jensen), *Sc. lactis* (von Demeter) und ähnliche eigene Stämme³⁸⁾.

Zur quantitativen Messung des Wachstums schien es richtiger, nicht die Säuerung, die zwar unter bestimmten Bedingungen ein Maß für das Wachstum darstellt, sondern die Trübung zu messen, wozu sich das lichtelektrische Colorimeter von B. Lange als sehr geeignet erwiesen hat. Denn nach den Untersuchungen von Braz u. Allen³⁹⁾ dürften bei den Milchsäurebakterien wahrscheinlich auch Faktoren vorkommen, die die Säuerung beschleunigen, ohne auf das Wachstum zu wirken. Solche Substanzen würden dem von Eulerschen Faktor Z⁴⁰⁾ bei der Hefe entsprechen. Dieser beeinflusst ebenfalls nur die Gargeschwindigkeit, nicht das Wachstum (Kögl⁴¹⁾).

Für die Wuchsstoffversuche hatte ich ein ganz ähnliches Grundmedium entwickelt wie Snell, Strong u. Peterson³⁾, ersetzte aber schon frühzeitig die Eiweißhydrolysate (Gelatine, Pepton, Casein) durch ein Gemisch von kristallisierten Aminosäuren. Dabei zeigte sich sofort, daß in den Hydrolysaten

²⁷⁾ R. J. Williams u. D. H. Saunders, *Biochemical J.* **28**, 1887 [1934].

²⁸⁾ J. Amer. chem. Soc. **61**, 1616 [1939].

²⁹⁾ Ebenda **60**, 3086 [1938], vgl. ferner W. C. Evans, W. R. C. Haniel u. F. C. Rappold, *Brit. J. exp. Pathol.* **20**, 586 [1939].

³⁰⁾ H. H. Weinstein, H. K. Mitchell, E. F. Pratt u. R. J. Williams, *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 1421 [1939].

³¹⁾ Ebenda **58**, 605 [1936].

³²⁾ *J. Bacteriol.* **34**, 381 [1937].

³³⁾ J. biol. Chemistry **130**, 417 [1939].

³⁴⁾ Siehe z. B. R. J. Williams, *Science New York* **88**, 486 [1939], vgl. N. N., ebenda **88**, Suppl. 8 [1939].

³⁵⁾ F. Eichholtz u. W. Keil, *Chemiker-Ztg.* **59**, 1033 [1935].

³⁶⁾ W. Keil u. L. Weyrauch, *Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. II* **97**, 90 [1937].

³⁷⁾ Naunyn-Schroederbergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **184**, 90 [1936]; ferner E. F. Möller u. R. Ferdinand, *Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. II*, **97**, 94 [1937].

³⁸⁾ Siehe die Diss. von E. Niederdeppe, W. Hild (beide Heidelberg 1938) u. N. Rucker, W. Kirchner (beide Heidelberg 1939).

³⁹⁾ Annual Soc. Agric. Bacteriologists, Edinburgh [1937].

⁴⁰⁾ H. von Euler u. O. Swartz, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **140**, 146 [1924], ferner H. von Euler u. H. Larsson, ebenda **223**, 189 [1934].

⁴¹⁾ *Naturwiss.* **25**, 465 [1937].

¹⁹⁾ *Plant Physiol.* **11**, 795 [1936].

²⁰⁾ C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **206**, 1414 [1938].

²¹⁾ *Science New York* **90**, 41 [1939].

²²⁾ W. H. Schopfer, *Ber. Schweiz. bot. Ges.* **43**, 389 [1934]; *Arch. Mikrobiol.* **5**, 511 [1934].

²³⁾ E. L. Tatum, H. G. Wood u. W. H. Peterson, *J. Bacteriol.* **32**, 167 [1936]; E. E. Snell, E. L. Tatum u. W. H. Peterson, ebenda **33**, 207 [1937].

²⁴⁾ *J. Amer. chem. Soc.* **60**, 2825 [1938].

²⁵⁾ R. J. Williams, C. M. Lyman, G. H. Goodyear, J. H. Truesdale u. D. Holaday, ebenda **55**, 2912 [1933]; C. J. Williams, J. H. Truesdale, H. H. Weinstein jr., E. Rohrmann, C. M. Lyman u. C. H. McBurney, ebenda **60**, 2719 [1938].

²⁶⁾ R. J. Williams, 16. int. Physiologenkongress, Zürich. Ref. diese Ztschr. **51**, 739 [1938].

noch weitere Faktoren enthalten waren, die besonders reichlich in Hefe vorkommen. Einer dieser Faktoren ließ sich mit dem von Kuhn u. Wendt⁴²⁾ aus Hefe isolierten und synthetisierten Vitamin B₆ oder Adermin, dem antidermatitischen Rattenfaktor, identifizieren: Sowohl kristallisierte Präparate aus Hefe⁴³⁾, wie ganz anders dargestellte Kristallisate aus Reiskele⁴⁴⁾ und schließlich synthetisches Adermin⁴⁵⁾ waren in der Konzentration von 10^{-6} g/cm³ optimal wirksam. In einer weiteren Arbeit⁴⁶⁾ konnte ich dann zeigen, daß die Spezifität des Adermins bei Milchsäurebakterien fast genau so groß ist wie bei der Ratte (s. Tab. 4).

Tabelle 4.

Spezifität von Adermin bei *Sbm. plantarum* (10 S)⁴⁶⁾ und bei der Ratte⁴⁶⁾.

	Aderminderivat	Sbm. plant.		Ratte	
		Effekt	Konzentrat. 10 ⁻⁶ g/cm ³	Effekt	Konzentrat. γ/Tag/Ratte
I.	Aderminhydrochlorid ...	+++	0,5–1,0	+++	7,5–10
II.	Adermin (freie Base) ...	+++	~0,8	+++	6–8
III.	Adermin-methyl-äther I*)	+++	510	+++	~5000
IV.	Adermin-methyl-äther II**)††) ...	++(+)	64–128		
V.	Adermin-acetat**)††) ...	++	16–128	+++	10–13
VI.	Iso-adermin**)††) ...	++(+)	123–256	○	200
VII.	4-Desoxy-adermin ...	+	16–128	○	200
VIII.	4,5-Di-desoxy-adermin ...	○	256	○	200

I. (II.) = 2-Methyl-3-oxo-4,5-di-[oxymethyl]-pyridin(chlorhydrat).

II. = 2-Methyl-3-methoxy-4,5-di-[oxymethyl]-pyridin.

IV. = 2-Methyl-3-oxo-4-methoxymethyl-5-oxo-methylpyridin-chlorhydrat.

V. = 2-Methyl-3-oxo-4,5-di-[acetoxymethyl]-pyridinchlorhydrat.

VI. = 2-Oxy-methyl-3-oxo-4-methyl-5-oxomethyl-pyridin-chlorhydrat.

VII. = 2-Methyl-3-oxo-4-methyl-5-oxomethyl-pyridin.

VIII. = 2-Methyl-3-oxo-4,5-dimethyl-pyridin.

*) Das Präparat enthielt ~0,2% Adermin.

**) Bisher unveröffentlicht.

†) Um Spaltung beim Sterilisieren zu verhindern, wurden diese Verbindungen (gelöst in steriliem destilliertem Wasser) erst nach dem Sterilisieren der übrigen Nährbestandteile zugegeben.

††) In einem andersartig angestellten Test waren diese Präparate bis $256 \cdot 10^{-6}$ g/cm³ völlig wirkungslos.

Zwanzig weitere Pyridinderivate waren selbst in hohen Konzentrationen (bis $256 \cdot 10^{-6}$ g/cm³) völlig inaktiv. Adermin erwies sich bei 17 Milchsäurebakterienstämmen (7 Arten) als unbedingt zum Wachstum erforderlich.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß auch eine untergärrige Hefe aus Sauerkraut, die bisher botanisch noch nicht näher definiert wurde, auf die Gegenwart von Vitamin B₆ im Nährmedium angewiesen ist. Doch genügen hier interessanterweise viel kleinere Konzentrationen von der Größenordnung 10^{-8} g/cm³ ⁴²⁾.

Dies konnten auch später Eakin u. Williams⁴⁸⁾ für Fleischmanns Hefe bestätigen. Bei anderen Hefen, die von Schultz, Atkin u. Frey⁴⁷⁾ untersucht wurden, stimmte die optimale wirksame Konzentration größenordnungsmäßig mit der von mir bei den Milchsäurebakterien gefundenen überein. Hutchings u. Woolley²¹⁾ fanden, daß Adermin auch für einen hämolytischen Streptokokkus erforderlich ist. Es ist schließlich nicht uninteressant, daß bis heute nur noch ein weiterer (Wachstums-)Effekt für Adermin bekanntgeworden ist, u. zw. die Förderung des Wachstums isolierter Tomatenwurzeln (Robbins u. Schmidt⁴⁹⁾).

4. Faktor „G“.

Sehr viele Eiweißhydrolysate (Casein, Pepton, Globin aus Hämoglobin, Zein, reinstes Vitellin aus Eigelb u. a.) sowie Hefe und Leber enthalten außer B₆ — wie erwähnt — noch einen weiteren Faktor, der von mir mit „G“ bezeichnet wurde⁴⁵⁾. Er scheint nicht unbedingt zum Wachstum erforderlich zu sein, erzeugt aber einen zusätzlichen Wachstumseffekt von etwa 50%, sowie eine ausgesprochene Wachstumsbeschleunigung. Seine Einheitlichkeit ist fraglich, und es ist nicht unwahrscheinlich, daß er z. T. aus noch unbekannten (bzw. mir nicht zugänglichen) Aminosäuren besteht.

5. Komplex „H“ (Nicotinsäure, Adenin, Biotin, Faktor H', Faktor J).

Bei der Reinigung von Pantothenensäure am Kaiser Wilhelm-Institut für medizinische Forschung wurde eine neue mit „H“ bezeichnete Fraktion abgetrennt. Diese konnte aufgelöst werden in 5 Faktoren: Nicotinsäure, Adenin, Biotin, Faktor H' und Faktor J.

42) Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 780, 1118 [1938].

43) E. F. Möller, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 254, 285 [1938].

44) E. F. Möller, O. Zima, F. Jung u. Th. Möll, Naturwiss. 27, 228 [1939].

45) E. F. Möller, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 260, 246 [1939], ferner auch diese Ztschr. 52, 460 [1939].

46) J. Amer. chem. Soc. 61, 1932 [1939].

47) Ebenda 61, 1931 [1939].

48) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 25, 1 [1939].

Die Notwendigkeit von Nicotinsäure, die man ebenfalls zu den B-Vitaminen rechnen kann und die bekanntlich die als „black tongue“ bezeichnete Mangelkrankheit von Hunden zu heilen imstande ist, wurde zuerst von Snell, Strong u. Peterson⁵⁴⁾ für *Sbm. casei* und *L. arabinosus* gefunden. Sie wirkt optimal bei $\sim 10^{-6}$ g/cm³.

Für *Sbm. plantarum* ließ sich die Notwendigkeit von Nicotinsäure — dasselbe gilt auch für Adenin und die beide zusammen ersetzende Cozymase — zwar häufig nachweisen⁴⁵⁾, vielfach waren aber beide Substanzen nicht unbedingt oder sogar überhaupt nicht nötig. Die Fähigkeit von *Sbm. plantarum*, Nicotinsäure und Adenin zu synthetisieren, scheint von noch unbekannten Umständen abzuhängen.

Zum Vergleich sei hier der Pfeiffersche Influenzabazillus genannt, der nach Lwoff⁵⁵⁾ nicht in der Lage ist, Cozymase aus den Einzelkomponenten zu synthetisieren und deshalb — als einziger bisher bekannter Mikroorganismus — auf das ganze Cozymasemolekül angewiesen ist.

Während Adenin bei anderen Lebewesen als Wachstumsstoff mit Sicherheit bisher noch nicht nachgewiesen wurde⁵⁰⁾, ist die Nicotinsäure ein für sehr viele Organismen bedeutungsvoller Wachstumsstoff⁵¹⁾. Es liegen auch bereits vergleichende Spezifitätsuntersuchungen⁵²⁾ bei „black tongue“ und verschiedenen Bakterien vor, die im wesentlichen übereinstimmende Ergebnisse, im speziellen jedoch interessante Unterschiede ergeben haben. Für Milchsäurebakterien sind solche Untersuchungen bisher leider noch nicht ausgeführt worden.

Die Wirksamkeit von Biotin ließ sich mit einem kristallisierten Präparat von Biotinmethylester von Kögl feststellen⁴⁵⁾. Dieser wirkte jedoch erst in einer Konzentration von 4 bis $16 \cdot 10^{-9}$ g/cm³ optimal; die Annahme, daß *Sbm. plantarum* den Ester nur schwer spalten kann, erwies sich als richtig, denn nach Verseifung stieg die optimale Wirksamkeit auf $0,5 - 1,0 \cdot 10^{-9}$ g/cm³. Biotin war bei den meisten hier untersuchten Stämmen zum Wachstum unbedingt notwendig.

Biotin (Bios II), das von Kögl u. Tönnis⁵³⁾ nach etwa 3 000 000-facher Anreicherung aus chinesischem Trockeneigelb isoliert wurde, ist auch für die Milchsäurebakterien der bisher aktivste Wachstumsstoff. Biotin und Biotinmethylester sind für *Sacch. cerevisiae* (Rasse M) gleichwertig; leichte Spaltbarkeit des Esters scheint auch bei *Bacterium radicola* einzutreten, da nach Nilsson⁵⁴⁾ schon $0,5 \cdot 10^{-9}$ g Ester/cm³ optimal wirksam sind. Bei *Staph. pyogenes aureus*, der nach Kögl u. Wagendorn⁵⁵⁾ $\sim 5 \cdot 10^{-9}$ g/cm³ zum optimalen Wachstum benötigt, liegen die Verhältnisse dagegen wohl ähnlich wie bei *Sbm. plantarum*. Auch gewisse Schimmelpilze können nach Kögl u. Fries⁵⁶⁾ nur in Anwesenheit von Biotin gedeihen. Ganz kürzlich wiesen Snell u. Williams⁵⁷⁾ nach, daß Biotin als einziger Wachstumsstoff bei einem Stamm von *Clostridium acetobutylicum* notwendig ist.

Was schließlich die Faktoren „H“ und „J“ angeht, so besteht vielleicht ein Zusammenhang zwischen diesen und den kürzlich von Snell u. Peterson⁵⁸⁾ angegebenen Faktoren. Die letzteren ließen sich durch Kohleadsorption voneinander trennen; der an Kohle adsorbierbare Faktor kann übrigens nicht Biotin sein, da er mit Bleiacetat fällbar ist. Die beiden Faktoren von Snell u. Peterson können auch nicht mit dem Faktor „G“ zusammenhängen, da sie in einem G-haltigen Medium (Caseinhydrolysat) getestet werden. Die Unklarheiten über die richtige Einordnung dieser Faktoren werden aber noch größer, wenn man bedenkt, daß Snell u. Peterson mit *Sbm. casei*, wir mit *Sbm. plantarum* als Standardstamm arbeiten. Es ließ sich nämlich zeigen⁴⁵⁾, daß viele Caseistämme in einem System, das alle für *Sbm. plantarum* als

49) A. Lwoff u. M. Lwoff, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B 122, 352 [1937].

50) Z. B. K. Makino, Klin. Wochr. 17, 63 [1938].

51) a) bei *B. diphtheriae*: J. H. Mueller, J. biol. Chemistry 120, 219 [1937]; J. Bacteriol. 34, 429 [1937]. b) bei *Staph. aureus*: B. C. J. O. Knight: Biochemical J. 31, 731, 966 [1937]. c) bei *B. dysenteriae*: St. A. Koser, A. Dorfman u. F. Saunders, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 33, 311 [1938]; J. J. Kligler u. N. Grosowitz, J. Bacteriol. 38, 309 [1939]; N. Yosida, Fukuoka Acta med. 32, Nr. 9, 88 [1939]. d) bei *B. proteus*: P. Pildes, British J. exp. Pathol. 19, 239 [1938]. e) bei *Brucella*: G. P. Kerby, J. Bacteriol. 37, 495 [1939].

52) B. C. J. O. Knight u. H. McIlwain, Biochemical J. 32, 1241 [1938]; A. Dorfman, St. A. Koser u. F. Saunders, J. Amer. chem. Soc. 60, 2004 [1938]; M. Landy, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 38, 504 [1938], vgl. Nature, London 142, 618 [1938]; A. Lwoff u. A. Querido, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 130, 1569 [1939]; D. W. Woolley, F. M. Strona, R. J. Madden u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry 124, 3 [1938].

53) F. Kögl u. B. Tönnis, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 242, 43 [1936].

54) R. Nilsson, G. Bjälve u. D. Burström, Naturwiss. 27, 389 [1939].

55) Recueil Trav. chim. Pays-Bas 57, 747 [1938].

56) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 249, 93 [1937].

57) J. Amer. chem. Soc. 61, 3594 [1939].

58) E. E. Snell, J. biol. Chemistry 128, Scient. Proc. XIV [1939].

notwendig erkannten Substanzen (und darüber hinaus noch weitere Aminosäuren und Wuchsstoffe) enthält, nicht oder nur sehr schlecht gedeihen können, daß sie noch einen „Caseifaktor“ benötigen.

6. Aneurin.

Wenn wir die für Milchsäurebakterien bekanntgewordenen Wuchsstoffe übersehen, so fällt besonders auf, daß alle B-Vitamine außer Vitamin B₁ in das Wuchsstoffsystem gehören. Mir ist nur eine Arbeit bekanntgeworden, in der für einige homofermentative Arten die Notwendigkeit von Aneurin behauptet wird (Wood, Anderson u. Werkman)^{16,50}. Diese Behauptung ließ sich ganz kürzlich bestätigen, als die Weiterreinigung des Faktors J in Angriff genommen wurde. Aneurin zeigte bei Sbm. plantarum, das zu den homofermentativen Milchsäurebakterien gehört, eine optimale Wirksamkeit bei $\sim 10^{-8}$ g/cm³.

Vitamin B₁ ist bei gewissen Hefen^{27, 47, 60}) und bei den Propionisäurebakterien⁶¹) sowie bei anderen Bakterien, Schimmelpilzen und Protozoen (Kögl⁶⁶), Schöpfer⁶²), Robbins⁶³), Knight^{51b}), Lwoff⁶⁴) schon lange und mit Sicherheit als Wuchsstoff bekannt. Über die Ersetzbarkeit des Aneurins durch seine Pyrimidin- und Thiazolkomponente sowie über die Spezifitätsverhältnisse liegt eine ausgedehnte Literatur vor, die von Schöpfer⁶²) ausführlich referiert wurde.

7. Ascorbinsäure.

Die Wirkung von Vitamin C auf Milchsäurebakterien ist äußerst verschieden und noch vielfach unklar. Bei manchen Arten soll das Wachstum bzw. die Säuerung gefördert^{9,20,59}), bei vielen gehemmt werden und bei anderen uneinflusst bleiben. Sbm. plantarum wird erst durch sehr hohe Dosen gehemmt, bei 5% ist die Hemmung noch nicht vollständig⁶⁰). Ein wachstumsfördernder Effekt kleiner Dosen ließ sich bisher nicht feststellen.

Es dürfte ferner von Interesse sein, daß umgekehrt Milchsäurebakterien sehr verschiedenartig auf Ascorbinsäure einwirken. Manche Arten sollen sie vor Oxydation schützen oder Dehydroascorbinsäure reduzieren, andere Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure oder irreversibel oxydieren.

Noch wichtiger ist, daß es Arten geben soll, die Vitamin C synthetisieren können. Auch bei anderen Mikroorganismen wurden solche Effekte sehr häufig studiert, es besteht aber bisher m. E. nur in zwei Fällen völlige Klarheit: Lwoff⁶⁶), sowie Cailleau⁶⁶) zeigten die unbedingte Notwendigkeit von Ascorbinsäure für das Wachstum einiger Protozoen, und Büsing u. Peters⁶⁷) bewiesen im Tierversuch die Synthese von Ascorbinsäure durch B. prodigiosus.

IV. Aminosäuren.

Orla-Jensen¹²) hat gezeigt, daß das Wachstum der Milchsäurebakterien nicht an bestimmte Eiweißstoffe gebunden ist, wie die älteren Bakteriologen annahmen, sondern daß sie die einfachen Aminosäuren verwerten können, sofern nur gewisse Wuchsstoffe zugegen sind. Für die einzelnen Gattungen ergaben sich interessante Unterschiede im Aminosäurebedürfnis. Am anspruchsvollsten waren die Thermobakterien — u. zw. vielfach anspruchsvoller als die höheren Tiere und der Mensch —, die Streptobakterien kamen in der Hauptsache mit Ammonsalzen und Cystin (Histidin, Lysin) aus, während die Streptokokken sogar auf alle Aminosäuren (gelegentlich außer Histidin und Leucin) verzichten und ihr Eiweiß allein aus NH₄-Ionen aufbauen konnten. Im Gegensatz zu Orla-Jensen fanden bereits Snell u. Mitarb.³), daß bei den meisten Milchsäurebakterien Tryptophan erforderlich ist, u. zw. bei Sbm. casei in einer optimalen Konzentration von nur $3 \cdot 10^{-6}$ g/cm³. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß Orla-Jensen, der seine Aminosäureversuche in enteiweißter Molke durchführte, bei keinem der vielen von ihm untersuchten Stämme die Notwendigkeit von Tryptophan feststellen konnte.

Weitere Versuche in dieser Richtung sind bisher nur^{67a}) von mir und H. Hübschmann⁶⁸) ausgeführt worden und in Tab. 5 für Sbm. plantarum aufgezeichnet.

Tabelle 5.
Notwendigkeit von Aminosäuren bei Sbm. plantarum (Stamm 10 S)

Aminosäuren	Optimale Konzentration g/cm ³	Art des Effektes
Glutaminsäure	$\sim 3,0 \cdot 10^{-4}$	unbedingt erforderlich
Leucin	$\sim 4,0 \cdot 10^{-4}$	
Valin	$\sim 4,0 \cdot 10^{-4}$	
Asparaginsäure	$\sim 2,5 \cdot 10^{-4}$	
Isoleucin	$\sim 2,0 \cdot 10^{-4}$	
Methionin	$\sim 2,0 \cdot 10^{-4}$	Zu- und Anwachs-effekte; schwankend
Cystein	$< 1 \cdot 10^{-4}$	
Tryptophan	$< 1 \cdot 10^{-4}$	
Phenylalanin	$< 5 \cdot 10^{-4}$	
Alanin	$< 5 \cdot 10^{-4}$	

Glutaminsäure, Leucin, Asparaginsäure und Valin und nach neueren, unveröffentlichten Versuchen auch Isoleucin und Methionin sind zum Wachstum des Standardstamms 10 S unbedingt erforderlich. Für die vier ersten Aminosäuren gilt dies auch bei allen übrigen hier untersuchten Stämmen. Interessant ist besonders der große Bedarf an Glutaminsäure, die bekanntlich als Baustein vieler Eiweißstoffe in relativ hoher Konzentration vorkommt. Cystein, Alanin und Phenylalanin scheinen ebenfalls nötig zu sein, doch nicht unter allen Umständen; offenbar liegen hier ähnliche Verhältnisse vor wie bei Adenin und Nicotinsäure. Tryptophan war bei frisch isolierten Stämmen unbedingt erforderlich. Nach fortlaufenden Passagen in Gurkensaft oder Glucose-Mn⁺⁺-Bouillon erlangten diese Stämme aber offenbar die Fähigkeit, Tryptophan selbst zu synthetisieren; ähnliches fand übrigens auch Gladstone⁶⁹) bei einem Stamm von Staphylococcus aureus. Ein Ersatz aller oder eines Teils der Aminosäuren oder nur einer einzigen Aminosäure durch Lactoflavin ist uns bisher nicht nachzuweisen gelungen. Meine Ergebnisse über das Aminosäurebedürfnis verschiedener Milchsäurebakterien sind also vorläufig nicht mit denjenigen von Orla-Jensen in Übereinstimmung zu bringen. Bemerkenswert ist schließlich, daß es mir und Hübschmann⁶⁸) gelungen ist, verschiedene Aminosäuren durch die entsprechenden oder durch ähnliche Ketosäuren⁷⁰), nur schwer durch die entsprechenden Oxysäuren zu ersetzen. Die Spezifität der Aminosäuren ist also bei Sbm. plantarum noch größer als bei den Säugetieren, die nach Rose⁷¹) die α -Oxysäuren leicht verwerten können.

Auch für andere Mikroorganismen ist das Bedürfnis an Aminosäuren genauer geprüft worden: so für bestimmte Hefen durch Nielsen u. Hartelius⁷²), für Staphylococcus aureus (und andere pathogene Bakterien) durch Fildes, Knight u. Mitarb.^{69,73}), und für B. diphtheriae durch Mueller u. Mitarb.⁷⁴). Bei den Hefen erwiesen sich interessanterweise manche Aminosäuren, besonders β -Alanin, als toxisch, andere an sich unwirksame Aminosäuren hoben diese Wirkung nicht nur auf, sondern zeigten zusammen mit den toxischen Aminosäuren starke Zuwachseffekte⁷⁵). Praktisch und theoretisch von großer Wichtigkeit sind auch die Umzüchtungsversuche von Gladstone⁶⁹), dem es gelang, interessante Methoden ausfindig zu machen, um Staphylococcus aureus-Stämme völlig ihres Aminosäurebedürfnisses zu entwöhnen und sie damit zu befähigen, ihre Eiweißstoffe direkt aus anorganischem Stickstoff aufzubauen. Bei den Milchsäurebakterien sind ähnliche Versuche bisher nicht beschrieben worden; mir selbst ist es weder gelungen, den Nielsen-Hartelius-Effekt bei den Milchsäurebakterien wiederzufinden, noch geeignete Stämme erfolgreich umzüchten.

^{67a}) Über diesen Gegenstand sind mir (erst während der Korrektur) noch zwei neuere Arbeiten bekanntgeworden: A. A. Anderson, H. G. Wood u. C. H. Werkman, J. Bacteriol. **36**, 655 [1938] (Proc.) und H. G. Wood, Ch. Geiger u. C. H. Werkman, ebenda **38**, 112 [1939]. Darin wird besonders die Notwendigkeit von Tryptophan, Cystein, Threonin und Methionin bei gewissen Milchsäurebakterien erkannt; Glycin, Prolin und Oxyprolin sind (in Übereinstimmung mit den eigenen bisherigen Ergebnissen) nicht erforderlich, während sich Leucin und Isoleucin gegenseitig ersetzen sollen.

⁶⁸) H. Hübschmann, Physiologenkongress Heidelberg 1939, ref. diese Ztschr. **52**, 466 [1939].

⁶⁹) G. P. Gladstone, Brit. J. exp. Pathol. **18**, 322 [1937].

⁷⁰) Ketoglutarinsäure ist innerhalb der Fehlergrenze ($\pm 10\%$) genau so wirksam wie Glutaminsäure.

⁷¹) Literatur siehe z. B.: F. Haurowitz: Fortschritte d. Biochemie III, Leipzig [1938].

⁷²) Biochem. Z. **295**, 211, **296**, 171, 359 [1938].

⁷³) P. Fildes, G. Gladstone u. B. C. J. G. Knight, Brit. J. exp. Pathol. **14**, 189 [1939]; P. Fildes u. G. M. Richardson, ebenda **16**, 326 [1935].

⁷⁴) Z. B. J. H. Mueller u. J. Kapnick, J. Bacteriol. **30**, 525 [1935].

⁷⁵) Auch bei B. anthracis sind jetzt ähnliche Effekte bekannt geworden. Vgl. G. P. Gladstone, Brit. J. exp. Pathol. **20**, 189 [1939].

³⁹) Siehe ferner J. G. Davis u. J. McClellent, J. Dairy Res. **10**, 94 [1939].

⁴⁰) R. J. Williams u. R. R. Roehm, J. biol. Chemistry **87**, 581 [1930].

⁴¹) G. L. Tatum, H. G. Wood u. W. H. Peterson, Biochemical J. **30**, 1898 [1936]; H. G. Wood, A. A. Anderson u. C. H. Werkman, J. Bacteriol. **36**, 201 [1938].

⁴²) Arch. Mikrobiol. **5**, 511 [1934]; Z. Vitaminforsch. **4**, 187 [1935]; Erg. Biol. **16**, 1 [1939].

⁴³) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **24**, 53 [1938].

⁴⁴) Ann. Inst. Pasteur **61**, 580 [1938].

⁴⁵) C. R. heb. Séances Acad. Sci. **206**, 540 [1938]; C. R. Soc. Biol. **130**, 406 [1939].

⁴⁶) Ebenda **127**, 861, 1421 [1938]; **131**, 964 [1939]; **138**, 319 [1939].

⁴⁷) Biochem. Z. **304**, 184 [1940].

V. Über die Unstimmigkeiten zwischen den Ergebnissen verschiedener Autoren.

An einigen Stellen der bisherigen Ausführungen dürfte es aufgefallen sein, daß die Ergebnisse verschiedener Autoren sich widersprechen. In vielen Fällen können wir uns heute bereits ein Bild davon machen, wie diese unterschiedlichen Ergebnisse zustande gekommen sind.

Die Erfahrungen der Bios-Forschung lehren zunächst, daß Nähr- und Wachstumsstoffbedürfnisse der Hefen nicht nur von Art zu Art, sondern sogar von Stamm zu Stamm verschieden sein können^{76, 77}. Daß dies auch bei den Milchsäurebakterien der Fall ist, haben meine Ausführungen an verschiedenen Stellen gezeigt. Ferner ist das Wuchs- und Nährstoffbedürfnis von der Vorgeschichte des Stammes weitgehend abhängig; so sind sämtliche von mir unter gleichen Bedingungen aus verschiedenen Silagen gezüchtete Stämme von *Sbm. plantarum* hinsichtlich ihrer Ernährung weitgehend ähnl., obwohl ihr Stoffwechsel deutliche Unterschiede zeigt⁷⁸. Ein von *Orla-Jensen* nach anderer Methodik isolierter Stamm (P 24) hat aber ein etwas abweichendes Bedürfnis an Aminosäuren. Die Abhängigkeit des Aminosäurebedürfnisses von der Vorgeschichte des Stammes zeigen besonders eindrucksvoll die Umzüchtungsversuche von *Gladstone*⁷⁹ bei *Staphylococcus aureus*.

Solange es noch nicht möglich ist, bei Milchsäurebakterien in einer Nährlösung zu arbeiten, die sich aus lauter wohl definierten kristallisierten Substanzen zusammensetzt, können große Differenzen bei verschiedenen Autoren, die ganz verschiedene Medien benutzen, dadurch zustande kommen, daß Nähr- oder Wachstumsstoffe sich gegenseitig ersetzen können. Die Ersetzbarkeit von Lactoflavin durch Aminosäuren bei Propionsäurebakterien wurde bereits erwähnt¹⁹. *Kögl* u. *van Wageningen*⁸⁰ konnten zeigen, daß Biotin sowohl Aneurin als auch Nicotinsäure zu je 99% ersetzen kann, und *Mosher, Saunders, Kingery* u. *Williams*¹⁹ wiesen nach, daß bei Trichophyten interdigitale Pantothersäure, Aneurin, Lactoflavin oder Inosit bis zu einem gewissen Grade gleichwertig sind.

Schließlich ist der Reinheit aller kristallisierten Verbindungen — gerade im Hinblick auf die eben geschilderten Vertretbarkeits-effekte — große Aufmerksamkeit zu schenken. Eigene und zum Teil mit *H. Hübschmann* durchgeführte unveröffentlichte Versuche haben z. B. ergeben, daß natürliche, aber auch synthetische Aminosäuren des Handels nicht nur bis zu einigen Prozent andere Aminosäuren, sondern auch Spuren weiterer biologisch-aktiver Substanzen enthalten können.

VI. Hemmstoffe.

Als Gegenspieler der Wachstumsstoffe müssen spezifische, hochaktive in der Natur vorkommende Hemmstoffe angesehen werden. Es ist durchaus nicht abwegig, diese Stoffe neben Wachstumsstoffen und Nährstoffen zu untersuchen, denn das natürliche Wachstum muß ja aus einem weitgehenden Zusammenspiel fördernder und hemmender Substanzen hervorgehen (*Kögl*⁸¹). Spezifische Hemmstoffe sind zwar bei anderen Mikroorganismen beschrieben worden — ein hierher gehörender Fall ist z. B. der eben genannte *Nielsen-Hartelius-Effekt*⁷² bei Hefe —, bei den Milchsäurebakterien ist bis heute jedoch nichts in dieser Richtung bekanntgeworden⁷⁷.

Mit *Welsch* u. *Vollherbst* habe ich einige Untersuchungen über die Hemmbarkeit eines *Plantarum*-Stammes durch verschiedene Konservierungs- und Desinfektionsmittel sowie andere biologisch interessierende Körper durchgeführt, u. zw. im Hinblick auf praktische Fragen bei der Gärfutterbereitung. Das wichtigste Ergebnis mit *Vollherbst*⁷⁸ war die große Unempfindlichkeit gegenüber einigen gebräuchlichen Konservierungsmitteln, besonders Natriumformiat und Phenol, die bei Fäulnisbakterien (*Bacterium coli*, *Bacterium proteus*) um eine Zehnerpotenz und mehr stärker hemmend wirken. Das ist u. a. ein wesentlicher Grund, weswegen die Ameisensäure und ihre Salze heute in steigendem Maße als Siliermittel („Amasil“) Verwendung finden. Die Unempfindlichkeit von Streptobakterien, besonders von *Sbm. plantarum* gegen anorganische

Salze, ist übrigens schon lange bekannt (*Henneberg*⁷⁰), (*Orla-Jensen*¹), *Keil* u. *Weyrauch*⁸²). Der Stamm 10S wird z. B. erst durch 8–10% Kochsalz vollständig gehemmt, während viele andere Milchsäurebakterien bereits gegen schwach hypertonsche Lösungen empfindlich sind. Nicht uninteressant sind auch die Befunde mit *Welsch*⁸⁰ über die Empfindlichkeit von *Sbm. plantarum* gegen Indolderivate (Indol, Skatol, Gramin, β -Indolyl-essigsäure⁸¹), β -Indolylpropionsäure). Gewisse Stämme werden in Pflanzensäften noch in der Konzentration von 1:10000 vollständig gehemmt. Spätere Untersuchungen (*Bauknecht*⁸²) zeigten, daß die Hemmbarkeit anderer Bakterien, besonders der Fäulnisbakterien, von der gleichen Größenordnung ist.

VII. Die praktische Bedeutung der Untersuchungen über die Ernährungsverhältnisse der Milchsäurebakterien.

Im allg. wird angenommen, daß die Wachstumsstoff-Forschung rein theoretische Fragen behandelt und daß von ihr kaum praktische Ergebnisse erwartet werden können. Daß dem nicht so ist, zeigte bereits das Beispiel der Ameisensäure als Siliermittel. Noch in einer anderen Richtung muß ein Fortschritt für die Gärtechnik erwartet werden. *Keil* u. *Weyrauch*⁸² zeigten, daß *Bacterium acetylcholini* nicht in Apfel- und Birnensaft wachsen kann, auch wenn man die stark sauren Säfte entsprechend abstumpft. Eigene unveröffentlichte Untersuchungen führten dann zu dem interessanten Ergebnis, daß gerade die meisten Aminosäuren, die von *Sbm. plantarum* benötigt werden, in diesen Säften nicht in genügender Konzentration vorhanden sind. Fügt man deshalb die fehlenden Aminosäuren zu (unter Neutralisierung bis pH 5–6), so ist die spontane Gärung dieser Säfte nicht mehr rein alkoholisch, sondern zum größten Teil milchsauer. Obwohl alle Preßsäfte aus Knollen und Blättern von Pflanzen durchaus kein schlechtes Nährmedium für *Sbm. plantarum* darstellen, so gibt es doch einige, auf denen es ganz besonders üppig wächst (Maisblätter, Kartoffeln). Es muß deshalb möglich sein, aus anderen Pflanzen durch Zusatz der in diesem nicht optimal vorhandenen Nähr- und Wachstumsstoffe noch bessere Gärfutter zu erzeugen, als es schon heute gelingt. Dies dürfte gerade für die Bereitung von Gärungsgemüse für die menschliche Ernährung von großer Bedeutung sein.

Schließlich sei noch ein Beispiel aus einem Gebiet, das mit dem Gärfutterproblem verknüpft ist, genannt. Es ist bekannt, daß die Milch von Kühen, die hauptsächlich Gärfutter gefressen haben, nicht zu hartem Fettkäse (Emmentaler usw.) verarbeitet werden kann. Es ist sehr wahrscheinlich, daß in einer solchen Milch den Milch- und Propionsäurebakterien, die für das Entstehen dieser Käsesorten verantwortlich sind, bestimmte Wachstumsstoffe fehlen (*Demeter*⁸³). Diese oder ihre Vorstufen, oder vielleicht auch Wirkstoffe, die zu ihrer Bildung im Organismus der Kuh erforderlich sind, scheinen während der Vergärung des Futters zerstört zu werden.

Eine Lösung dieser Probleme, die alle im Rahmen des Vierjahresplanes liegen, ist nur zu erwarten durch die wissenschaftliche Aufklärung der Ernährungsverhältnisse bei den Milchsäurebakterien und deren Verwandten.

Die praktische Bedeutung der Wachstumsstoff-Forschung bei anderen Mikroorganismen liegt nach dem Obengesagten auf der Hand, wenn es sich um gärungstechnisch wichtige Lebewesen (Buttersäurebakterien, Butanol-Aceton-Bildner, Hefen, Schimmelpilze) handelt. Es darf aber genau so wenig der praktische Wert der Wachstumsstoff-Forschung bei pathogenen Mikroorganismen (Bakterien, Protozoen, Schimmelpilzen) unterschätzt werden. Es ist noch gar nicht abzusehen, welchen Aufschwung die bakteriologisch-diagnostischen Methoden, die bakteriologische Toxikologie, Immunologie, Serologie und ihre Anwendungsgebiete bei weiterer Kenntnis der Ernährungsbedingungen pathogener Mikroorganismen nehmen werden.

Eingeg. 18. März 1940. [A. 31.]

⁷⁶ A. M. Copping, Biochemical J. **23**, 1050 [1921]; ferner R. J. Williams, J. Amer. chem. Soc. **53**, 788 [1931], **51**, 2764 [1929], **49**, 227 [1927].

⁷⁷ Vgl. dagegen die kürzlich erschienenen Befunde von J. Rodenkirchen, Milchwirtschaftl. Forsch. **20**, 73, 82 [1939].

⁷⁸ M. Vollherbst, Dissertation Heidelberg, 1937.

⁷⁹ Handbuch der Gärungsbakteriologie Bd. 2, Berlin 1927.

⁸⁰ Dissertation Heidelberg 1938.

⁸¹ Eine Wachstumsstoffwirkung von β -Indolyl-essigsäure (dem pflanzlichen Streckungsstoff Heteroauxin) soll bei bestimmten Bakterien nach verschiedenen Autoren vorhanden sein (z. B. R. Pratt, Amer. J. Bot. **25**, 498 [1938]; E. Ball, J. Bacteriol. **38**, 559 [1938]; M. A. Brannon u. A. F. Bartsch, Amer. J. Bot. **26**, 271 [1939]). Bei Milchsäurebakterien ist bisher keine Wachstumsstoffwirkung von Heteroauxin nachgewiesen worden. Weitere Literatur siehe im Referat von A. Janke, Zbl. Bacteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II, **100**, 409 [1939].

⁸² Zbl. Bacteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Abt. I, **140**, 101 [1937].

⁸³ Ebenda **144**, 154 [1939]; vgl. a. C. Gorini, Die dyogenetische Milch, Ber. XI. Milchwirtschaft. Welt-Kongress, Berlin 1937.