

**Fritz Kögl:**  
**Über Wuchsstoffe der Auxin- und der Bios-Gruppe.**

[Zusammenfassender Vortrag, gehalten vor der Deutschen Chemischen Gesellschaft am 1. Dezember 1934; eingegangen am 3. Dezember 1934.]

Leben ist nicht gleichbedeutend mit Wachstum, aber Wachstum ist wohl das eindrucksvollste Kennzeichen des lebenden Organismus. Was ist Wachstum? Obschon wir von dieser Erscheinung alle eine konkrete Vorstellung haben, ist es gar nicht ganz leicht, eine umfassende Definition des Begriffes zu geben. F. A. F. C. Went<sup>1)</sup> definiert Wachstum bei Pflanzen mit irreversibler Volum-Vergrößerung. Die biologische Forschung lehrt, daß das Tier fast ausschließlich durch Zellteilung wächst. Auch der Zellzuwachs pflanzlicher Mikroorganismen ist als Zellteilungs-Wachstum zu bezeichnen. Dagegen haben wir bei der höheren Pflanze neben der Zellteilung die Zellstreckung als zweite Wachstums-Stufe. Von medizinischer Seite wurde gelegentlich die Meinung geäußert, daß die in der Tier-Physiologie unbekannte Zellstreckung kein eigentliches Wachstum sei. Demnach wäre Wachstum mit Zellvermehrung zu definieren; wir dürften dann aber z. B. nicht mehr sagen, daß das Gras wachse — denn das was wir hierbei äußerlich an Volum-Zunahme sehen, wird vorwiegend durch Zellstreckung verursacht. Man tut also gut daran, auch die pflanzliche Zellstreckung als Wachstum gelten zu lassen.

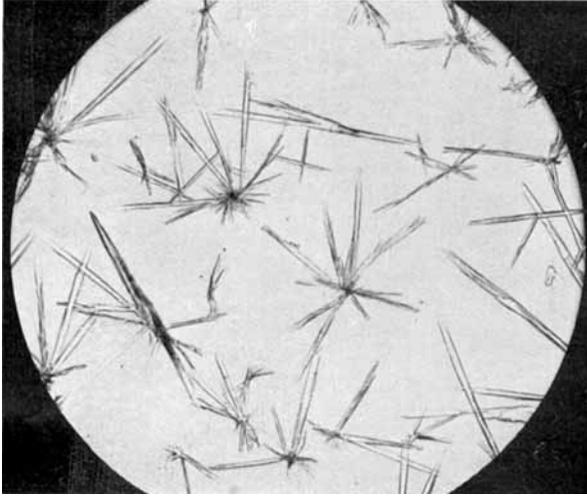
In chemischer Hinsicht ist Wachstum ein Stoffwechsel-Problem; während man nun aber vor 1—2 Jahrzehnten die Annahme machen mußte, daß seine Regelung ausschließlich durch das Zusammenspiel der zahlreichen Enzyme erfolge, hat man seither auch die Rolle verhältnismäßig einfach gebauter „Wuchsstoffe“ entdeckt. Man hat sie beim Menschen und beim Tier in bestimmten Hormonen und Vitaminen kennengelernt; bei der Pflanze konnte die Existenz solcher „Regulatoren“ erst sehr viel später biologisch nachgewiesen werden. Derartige pflanzliche Wuchsstoffe liegen z. B. in den Auxinen vor, die wir als Phyto-hormone der Zellstreckung bezeichnen können.

Die Entdeckung und der Nachweis<sup>2)</sup> der Auxine ist in den letzten Jahren häufig beschrieben worden, so daß ich mich hier auf die Zusammenfassung in der folgenden Abbildung beschränken darf:

---

<sup>1)</sup> S. Kostytschew u. F. A. F. C. Went, Lehrbuch der Pflanzen-Physiologie, 2. Band, S. 254 (Verlag J. Springer, Berlin 1931).

<sup>2)</sup> vergl. Ztschr. physiol. Chem. **214**, 241 [1933]; dort auch unsere weiteren Arbeiten über pflanzliche Wachstumsstoffe (13. Mitteil.: *ibid.* **228**, 113 [1934]).

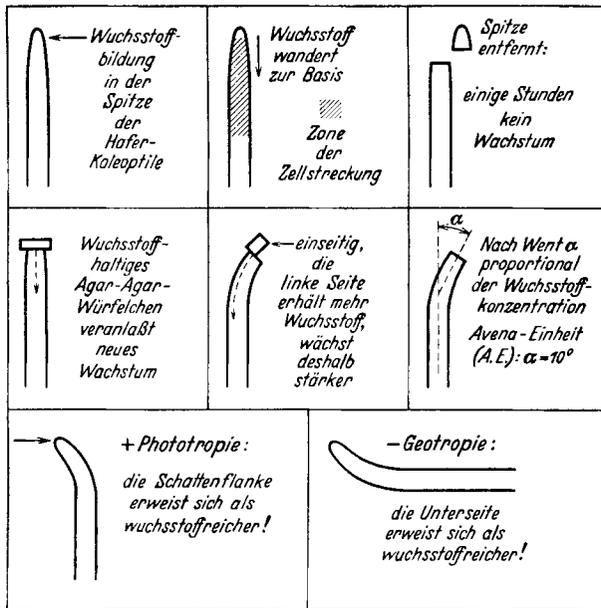


Biotin aus Alkohol.



Wachstum von Hefezellen im hängenden Tropfen unter der Wirkung von kryst. Biotin.

(Salz-Zucker-Nährlösung, 50 S.-E. Biotin pro  $\gamma$  Hefe; Wachstums-Dauer 10 Stdn.).



Mit Hilfe der Went'schen Test-Reaktion ist es uns in den letzten Jahren gelungen, Auxine in kristallisierter Form zu isolieren. Hr. Dr. Haagen-Smit hat hierbei vor allem den physiologischen, Fr. Dr. Erxleben vorwiegend den chemischen Teil der Untersuchungen ausgeführt<sup>3)</sup>. Die folgende Tabelle enthält einige kurze Angaben über die Ausgangs-Materialien, die erforderliche Anreicherung, die Zusammensetzung der Krystallisate und ihre durchschnittliche physiologische Wirksamkeit:

Bezeichnung	Isoliert aus	Erforderliche Anreicherung	Formel	Durchschnittl. Wirksamkeit
Auxin-a . . . . .	Harn Maisöl	40 000-fach 300 000-fach	$C_{18}H_{32}O_5$	$50 \times 10^9$ A.-E. pro Gramm
Auxin-b . . . . .	Malz Maisöl	300 000-fach 300 000-fach	$C_{18}H_{30}O_4$	$50 \times 10^9$ A.-E. pro Gramm

Auxin-a,  $C_{18}H_{32}O_5$ , enthält nach der analytischen Untersuchung eine Carboxylgruppe, drei alkoholische Hydroxyle, eine Doppelbindung und einen Kohlenstoffring. Von den vier Sauerstoffatomen des Auxins-b,  $C_{18}H_{30}O_4$ , liegen zwei ebenfalls in einer Carboxylgruppe, eines in einem alkoholischen Hydroxyl und eines in einer Ketogruppe vor. Auch Auxin-b enthält eine Doppelbindung und einen Kohlenstoffring. Die Mutarotation, welche die Lösungen beider Auxine zeigen, wird durch die Bildung von Lactonen verursacht; aus dem zeitlichen Verlauf der Mutarotation schlossen wir, daß es

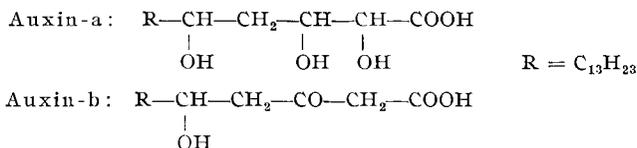
<sup>3)</sup> Der I.-G. Farbenindustrie A.-G., insbesondere Hrn. Prof. Hörlein, Elberfeld, möchten wir für die mannigfache Unterstützung unserer Arbeiten auch an dieser Stelle danken.

sich hierbei wahrscheinlich um die Bildung von  $\delta$ -Lactonen handelt, und daß demnach in  $\gamma$ -Stellung zum Carboxyl wahrscheinlich keine Hydroxylgruppe vorhanden sein dürfte.

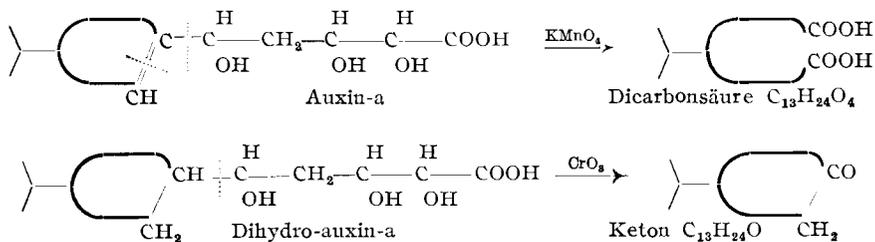
Schließlich war bei Auxin-b auch noch eine Angabe über die relative Lage des Carbonyls zur Carboxylgruppe zu machen. Auxin-b spaltet nämlich beim Schmelzpunkt Kohlendioxyd ab und geht hierbei in ein Neutralprodukt über; wir faßten daher Auxin-b als  $\beta$ -Keto-säure auf.

Im Laufe von 3 Jahren haben wir 800 mg Auxine in kristallisierter Form in Händen gehabt; hiervon ist ein beträchtlicher Teil für die Darstellung der funktionellen Derivate verbraucht worden, so daß für die Abbau-Versuche bisher nur 400 mg zur Verfügung standen.

Schon der erste Abbau von Auxin-a — die Oxydation mit Permanganat in soda-alkalischer Lösung — führte zu einem Erfolg. Es entstand eine optisch aktive, kristallisierte Dicarbonsäure der Formel  $C_{13}H_{24}O_4$ ; dieselbe Säure wurde auch durch Oxydation von Auxin-b erhalten, so daß an der nahen Verwandtschaft beider Hormone kaum mehr zu zweifeln war:



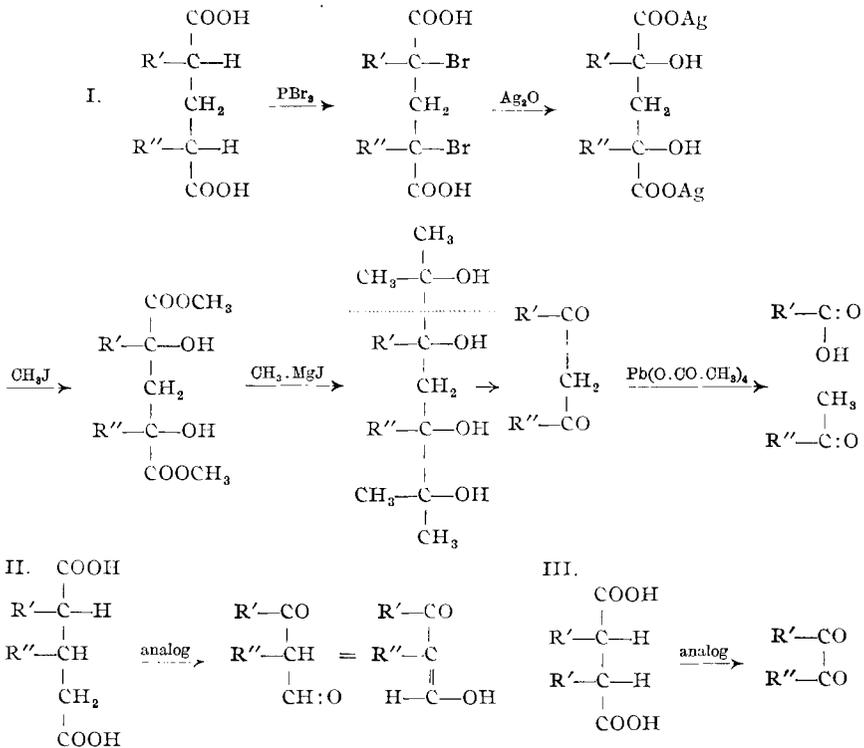
Der zweite Abbau ging vom Dihydro-auxin-a aus, das in Eisessig-Lösung mit Chromtrioxyd oxydiert wurde. Hierbei entstand, neben Oxalsäure, ein optisch aktives Neutralprodukt, für das sich aus der Analyse des kristallisierten *p*-Nitrophenyl-hydrazons die Formel  $C_{13}H_{24}O$  ableitet. Offensichtlich liegt das der  $C_{13}$ -Säure entsprechende Ringketon vor, denn bei diesen beiden Abbauprodukten sind mit der Abspaltung eines  $C_5$ -Restes auch die Hydroxyle bzw. die Carbonylgruppe verschwunden. Die Abbau-Ergebnisse ließen sich am einfachsten so deuten, daß der sauerstoff-reiche  $C_5$ -Rest von der Doppelbindung abzweigt, und daß sich diese selbst im Ring befindet:



Nun mußte festgestellt werden, wieweit die Carboxyle der  $C_{13}$ -Dicarbonsäure voneinander entfernt waren; aus den Eigenschaften der Säure war zunächst nur eine Malonsäure-Gruppierung der Carboxyle auszuschließen. Nachdem Modellversuche gezeigt hatten, daß die Blancsche Reaktion noch mit 20 mg Substanz einwandfreie Ergebnisse liefert, wurde diese Reaktion mit der Abbau-Säure durchgeführt. Es entstand kein Brenzketon, sondern ein Säure-anhydrid. Säure-anhydrid-Bildung bei der Blancschen Reaktion ist bei Glutar- und Bernsteinsäuren die Regel, bei Adipinsäuren die Ausnahme. In Zusammenhang mit der vorhin angeführten Arbeits-Hypothese

schien es uns nunmehr am wahrscheinlichsten, daß wir eine substituierte Glutarsäure in Händen hatten. Viel war damit allerdings noch nicht gewonnen, denn wenn wir richtig gerechnet haben, gibt es theoretisch 1200 Glutarsäuren der C<sub>13</sub>-Reihe, abgesehen von den zugehörigen optisch aktiven Formen. Trotz dieser entmutigenden Zahl haben wir die Synthese und die Spaltung verschiedener C<sub>13</sub>-Glutarsäuren durchgeführt, um uns im Aufbau und Abbau dieser Verbindungen zu üben. Für den Abbau der C<sub>13</sub>-Säure zu bekannten Verbindungen schien mindestens 1/2 g Substanz nötig zu sein, für deren Gewinnung man 1 g kristallisiertes Auxin verarbeiten müßte. Wir haben uns vor einem Jahr alle erdenkliche Mühe gegeben, dieses kostbare Material herbeizuschaffen. Aber aus 2000 l Harn erhielten wir im Großbetrieb weniger Krystallisat, als früher mit 150 l im Kleinbetrieb. Die Großaufarbeitung von Malz scheiterte daran, daß die allermeisten Sorten weniger als 0.001<sup>0</sup>/<sub>00</sub> Auxin-b enthalten; nur ein glücklicher Zufall hat uns zweimal eine Sorte mit 0.001<sup>0</sup>/<sub>0</sub> in die Hände gespielt.

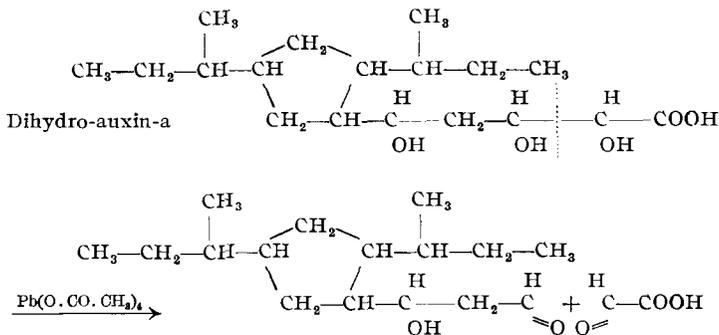
Trotz aller Bemühungen hatten wir schließlich doch nur 90 mg der C<sub>13</sub>-Säure für den Abbau zur Verfügung. Glücklicherweise ist es aber gelungen, durch einen einzigen Abbau-Versuch, den meine ausgezeichnete Mitarbeiterin durchgeführt hat, von den 1200 Formeln die richtige herauszufinden. Unser Arbeits-Plan bestand darin, die Dicarbonsäure von zwei Seiten aus um je ein C-Atom zu kürzen; wir bedienten uns hierbei eines Verfahrens, wie es z. B. in der Literatur beim Abbau von hydrierten Carotinen beschrieben ist. Das folgende Formel-Schema zeigt den Reaktionsverlauf für einige der in Betracht kommenden Möglichkeiten:



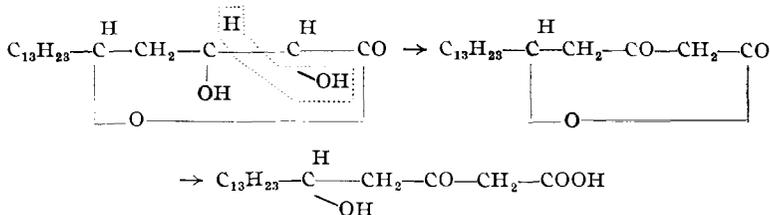


wegen der dem Auxin-a ganz analogen Mutarotation und wegen der leichten  $\text{CO}_2$ -Abspaltung für weniger wahrscheinlich gehalten.

Die Anordnung der Hydroxylgruppen von Auxin-a ist durch den Abbau von Dihydro-auxin-a mit Bleitetraacetat bewiesen; es entstanden die bei  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -Stellung der Hydroxyle zu erwartenden Spaltstücke, nämlich ein Oxy-aldehyd mit 16 C-Atomen und daneben Glyoxylsäure:



In allerletzter Zeit haben wir durch Destillation von Auxin-a-lacton mit Kaliumbisulfat ein Krystallisat erhalten, das nach dem Schmelzpunkt des Semicarbazons, der leichten  $\text{CO}_2$ -Abspaltung und der physiologischen Aktivität mit Auxin-b identisch sein dürfte:



Da über die Richtung der Wasser-Abspaltung aus dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hydroxyl kaum ein Zweifel sein kann, bildet diese Umwandlung von Auxin-a in Auxin-b eine wichtige Stütze für die oben gegebene Formulierung des Auxins-b als  $\beta$ -Keto-säure. Wir hoffen, daß die analytischen Befunde bald durch unsere synthetischen Arbeiten eine endgültige Bestätigung erfahren können.

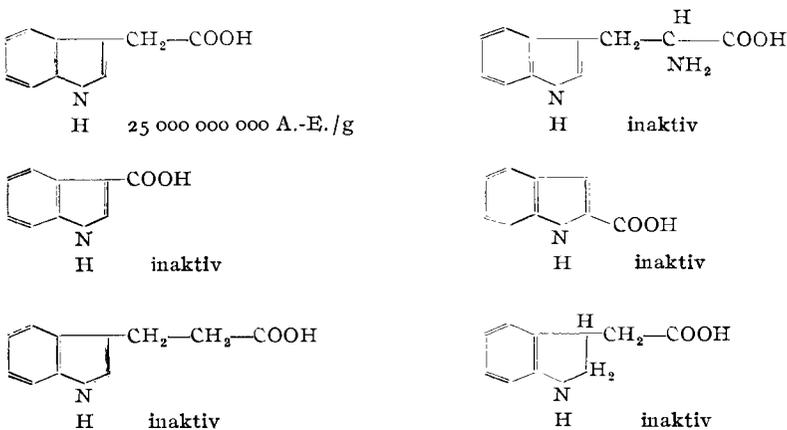
Wenn wir die Doppelbindung von Auxin-a hydrieren oder die Carboxylgruppe verestern, geht die physiologische Wirksamkeit verloren, es handelt sich also sicher um sehr konstitutions-spezifische Wirkungen. Um so größer war unsere Überraschung, als wir vor Jahresfrist in der  $\beta$ -Indolyl-essigsäure einen Stoff auffanden, der mit den Auxinen a und b nicht im geringsten verwandt ist und doch bei der Went'schen Test-Reaktion eine Wirksamkeit von  $25 \times 10^9$  A.-E. pro Gramm entfaltet, also etwa halb so aktiv ist wie die beiden bisher bekannten Auxine. Wir haben Hetero-auxin — wie wir die  $\beta$ -Indolyl-essigsäure nun aus praktischen Gründen auch nennen wollen — zuerst aus Harn isoliert. Es ist bekannt, daß die Säure durch bakteriellen Abbau aus Tryptophan entsteht. In Fällen mit ab-

normaler Darm-Flora kann der Harn beträchtliche Mengen der Säure enthalten; auch wir haben einen solchen Fall aufgefunden und den betreffenden Harn-Lieferanten gut honoriert, bis wir sahen, daß wir durch „falsches“ Auxin betrogen wurden....

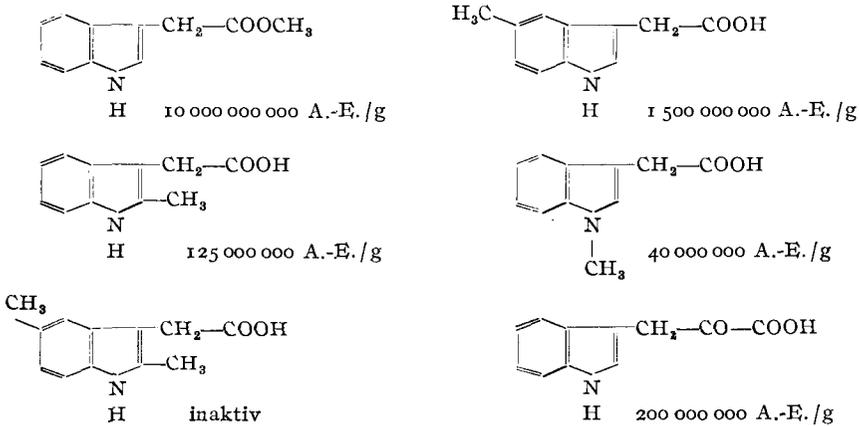
Sind nun aber wirklich die Auxine a und b die echten Auxine? Hr. Kostermans hat aus Hefe den bei der Hafer-Koleoptile wirksamen Streckungs-Wachsstoff nach 1000000-facher Anreicherung isolieren können; er war mit  $\beta$ -Indolyl-essigsäure identisch. Obschon wir Auxin-a und -b aus Malz und aus Maisöl isoliert haben, war es doch nicht von vornherein ausgeschlossen, daß auch von den Gräser-Spitzen — dem klassischen Versuchs-Objekt der botanischen Wachsstoff-Forschung — Hetero-auxin hervorgebracht würde.

Da der von 10 Arbeitskräften pro Tag zu gewinnende Rob-extrakt nur 1  $\gamma$  Auxin enthält, wäre die Frage nach der Natur des Gräser-Wachsstoffes durch Isolierung der aktiven Verbindung kaum je zu lösen. Durch einige glückliche Umstände war es aber doch möglich, die genannte Frage zu beantworten. Wie F. W. Went<sup>4)</sup> gezeigt hat, läßt sich auf biologischem Wege der Diffusionskoeffizient und damit das Molekulargewicht des Gräser-Wachsstoffes bestimmen. Man findet hierbei Werte um 350, in guter Übereinstimmung mit den für Auxin-a und -b berechneten Molekulargewichten. Dagegen gibt Hetero-auxin, auch in rohen Präparaten aus Hefe, das dem theoretischen Wert 175 entsprechende Molekulargewicht! In der Bestimmung der Säure- und Alkali-Beständigkeit fanden wir noch eine sehr willkommene, unabhängige Methode, nach der sich die Auxine leicht unterscheiden lassen. Hetero-auxin ist als Indol-Derivat empfindlich gegen heiße Säure, aber völlig beständig beim Kochen mit Lauge; bei Auxin-a ist es gerade umgekehrt, während Auxin-b durch beide Agenzien seine Aktivität einbüßt. Das experimentum crucis mit Spitzen-Extrakt sprach eindeutig dafür, daß in der Gräser-Spitze Auxin-a erzeugt wird!

Die leichte synthetische Zugänglichkeit von Verwandten der  $\beta$ -Indolyl-essigsäure veranlaßte uns natürlich zu Studien über ihre Konstitutions-Spezifität. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt:



<sup>4)</sup> Dissertat., Utrecht 1927, S. 51.



Wie man sieht, sind auch einige Homologe der  $\beta$ -Indolyl-essigsäure bei der Test-Reaktion aktiv, bleiben aber weit hinter der Wirksamkeit des Hetero-auxins zurück.

Vor einiger Zeit habe ich das Bild geprägt, daß Hetero-auxin ein Schlüssel für eine „Hintertüre“ sei. Wir dachten, daß Hetero-auxin z. B. einen Einfluß auf die Atmung hätte und dadurch indirekt auch die Zellstreckung befördere. J. Bonner<sup>5)</sup>, Pasadena, hatte nämlich mit rohen Wuchsstoff-Präparaten aus *Rhizopus* einen solchen Einfluß auf die Atmung beobachtet; Hr. van Hulssen konnte jedoch in meinem Institut mit den kristallisierten Auxinen keinen derartigen Einfluß feststellen. Dagegen zeigte sich eine verhältnismäßig gute Parallelität in dem Sinne, daß an Tagen mit hoher Auxin-Empfindlichkeit — also hohen Standard-Werten — die Pflanzen intensiver atmen. Im vergangenen Jahre<sup>6)</sup> waren wir zu dem Schluß gekommen, daß die Standard-Schwankungen auf Veränderungen in den luft-elektrischen Verhältnissen zurückzuführen seien. Inzwischen haben wir aber die damaligen Versuche fortgesetzt und gefunden, daß sie zwar experimentell zu bestätigen, aber doch anders zu deuten sind. Mit welchen Einflüssen wir es bei den mehrere Hundert Prozent betragenden Schwankungen in der Empfindlichkeit der Pflanzen zu tun haben, ist wieder dunkler denn je.

In der Tier-Physiologie haben in der jüngsten Zeit Untersuchungen über organ-bildende Stoffe, sogenannte Organisatoren, großes Interesse gefunden. Die von F. W. Went<sup>7)</sup> studierten wurzel-bildenden Stoffe sind hierzu in der Pflanzen-Physiologie ein Analogon. Hr. Kollege Went<sup>8)</sup>, Pasadena, hat mit unseren Auxin-Krystallisaten die Wurzel-Bildung bei Erbsen hervorrufen können; die Wirkung blieb allerdings in quantitativer Hinsicht hinter jener seiner Roh-extrakte zurück.

Inzwischen hat F. Laibach<sup>9)</sup> einen einfachen Test auf wurzel-bildende Stoffe beschrieben und auch mitgeteilt, daß derartige Verbindungen in einem

<sup>5)</sup> Journ. gen. Physiol. **17**, 63 [1933].    <sup>6)</sup> Angew. Chem. **46**, 469 [1933].

<sup>7)</sup> Proc. Kon. Akad. Wetensch., Amsterdam **32**, 1 [1929].

<sup>8)</sup> nach einer freundl. Privatmitteilung. — Anmerkung bei d. Korrekt.: Vergl. die nunmehr im Druck vorliegenden Abhandlungen Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **37**, 445, 456 [1934].

<sup>9)</sup> Naturwiss. **35**, 588 [1934].

Äther-Extrakt von Harn vorkommen. Wir haben krystallisiertes Auxin-a und Hetero-auxin nach diesem Test jetzt selbst geprüft und gefunden, daß beide noch in sehr kleinen Dosen bei *Tradescantia*-Stecklingen Wurzel-Bildung hervorrufen. Demnach hätten die Auxine eine doppelte Funktion — sie wären Phyto-hormone und Organisatoren. Noch nicht abgeschlossene Versuche über den Einfluß von „Bios“ auf die Wurzel-Bildung mahnen aber zur Vorsicht. Man wird hier — wie überhaupt bei der Organisor-Forschung — sehr darauf achten müssen, ob man es tatsächlich mit einem spezifischen Test zu tun hat. In unserem Fall ist das Test-Objekt ein Torso des betreffenden pflanzlichen Organismus, dem die normale Zufuhr von Phyto-hormonen aus anderen Pflanzenteilen fehlt. Wird dieser Ausfall behoben, so könnte der gestörte Ablauf der Lebens-Prozesse wieder in Gang kommen und damit auch die Neubildung von Organen erfolgen. Letzten Endes wäre dann aber der Organisor doch nicht in dem betreffenden Phyto-hormon, sondern in den chemisch weniger nahbaren Stoffen des Protoplasmas und der Zellkerne zu suchen.

Während die Auxin-Forschung und insbesondere die Organisor-Probleme Gebiete darstellen, die erst in den letzten Jahren für die chemische Bearbeitung zugänglich geworden sind, hat das „Bios“-Problem, dem wir uns nun zum Schluß zuwenden wollen, bereits eine lange geschichtliche Entwicklung durchgemacht.

In einer Polemik zwischen Liebig und Pasteur<sup>10)</sup> taucht das Problem zuerst auf. Pasteur war zu dem Ergebnis gekommen, daß für das Wachstum der Hefe nur ihre Asche, Ammoniumsals und ein vergärbare Zucker nötig seien. Dagegen behauptete Liebig, daß Hefe in einem solchen Milieu weder gäre, noch wachse. Pasteur forderte Liebig auf, sich mit eigenen Augen vom Gelingen des Versuchs zu überzeugen; er wolle ihm soviel Hefe züchten, als er billigerweise verlangen könne. Es war 1871, der alternde Liebig kam nicht, und die weitere Forschung schien Pasteur völlig recht zu geben. Da erschien im Jahre 1901 eine Arbeit von E. Wildiers<sup>11)</sup> aus dem Laboratorium von Prof. Ide in Löwen, die nicht geringes Aufsehen erregte. Wildiers teilte mit, daß es nach Pasteurs Bedingungen in der Tat nicht gelinge, Hefe zu züchten, wenn die zur Impfung verwendete Hefe-Menge genügend klein ist; zur Entwicklung der Hefe-Zellen sei vielmehr ein unbekannter, koch-beständiger Stoff organischer Natur nötig. Wildiers nannte diese rätselhafte Verbindung „Bios“ und gab der Hoffnung Ausdruck, daß dieser Name bald durch einen chemischen ersetzt werden könne.

Diese Erwartung hat sich nicht erfüllt, obwohl in den 33 Jahren die seither vergingen, mehr als 150 Arbeiten über die Bios-Frage erschienen sind. In dieser Literatur sind alle Schattierungen zwischen ironischer Ablehnung dieses neuen „Lebens-Elixiers“ einerseits und Berichte über die vermeintliche Isolierung von „Bios“ andererseits vertreten. Mit den Fortschritten der Vitamin-Forschung verstummt die negative Kritik; ja man sieht eine Weile in Bios wirklich das Vitamin der Organismen. Von den Vitaminen, die seither isoliert werden konnten, war jedoch keines mit Bios identisch. An seiner Existenz zweifelt heute kaum noch jemand; man weiß aber nicht, ob Bios eine allgemeine physiologische Bedeutung besitzt, oder nur beim Wachstum bestimmter Hefe-Rassen eine Rolle spielt.

<sup>10)</sup> Ann. Chim. Phys. [4] 25, 145 [1872].

<sup>11)</sup> La Cellule 18, 313 [1901].

Die Tatsache, daß verschiedene Hefe-Rassen verschiedenen Bios-Bedarf haben, ist im Jahre 1929 durch eine wichtige Untersuchung von A. M. Copping<sup>12)</sup> kargestellt worden. Wilde Hefen, die gut atmen und schlecht gären, bringen selbst Bios hervor und sind nicht auf dessen Zufuhr von außen angewiesen. Dagegen brauchen die gut gärenden, hochgezüchteten Kultur-Hefen in synthetischer Nährlösung einen Zusatz von Bios für ihr normales Wachstum; zwischen diesen Extremen gibt es natürlich viele Zwischen-typen. Es ist gut denkbar, daß schon die Polemik zwischen Liebig und Pasteur durch die Verwendung verschiedener Hefe-Rassen verursacht wurde.

Weitere Komplikationen traten in der Bios-Forschung durch die Anwendung verschiedenartiger Test-Methoden auf, nicht zuletzt aber dadurch, daß Bios keine einheitliche Verbindung ist, sondern aus zwei oder mehreren Faktoren besteht.

Bios I, einer dieser Faktoren, ist durch E. V. Eastcott<sup>13)</sup> im Institut von Lash Miller in Toronto als *meso*-Inosit erkannt worden. Über Versuche zur Anreicherung von Bios II oder von weiteren Faktoren ist in den letzten Jahren vor allem von dem genannten kanadischen Arbeitskreis, dann von R. J. Williams<sup>14)</sup> in Oregon und von v. Euler<sup>15)</sup> in Stockholm mit ihren Mitarbeitern berichtet worden. Aus der Literatur ist nicht zu entnehmen, daß Bios II oder ein weiterer Faktor nennenswert angereichert werden konnte, die besten Präparate scheinen nur 10—30-fach konzentriert zu sein<sup>16)</sup>.

Vor 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Jahren haben wir in Utrecht die Bearbeitung des Bios-Problems in Angriff genommen, in der Absicht, den Studien über Wuchsstoffe der Zellstreckung solche über Wuchsstoffe der Zellteilung anzuschließen. Ob man bei den Versuchen zur Isolierung der Bios-Faktoren wirklich ein Phytohormon der Zellteilung auffinden würde, das war bei dem damaligen Stand der Bios-Forschung nicht vorauszusagen. Im Gegenteil! Nachdem *meso*-Inosit als einer der Bios-Faktoren erkannt war, mußte man damit rechnen, daß auch die anderen Faktoren spezifische Nahrungs- oder Baustoffe waren, welche von den Kultur-Hefen nicht mehr in ausreichendem Maße selbst synthetisiert werden konnten.

Als Test-Hefe verwenden wir eine Brennerei-Oberhefe (Rasse M vom Institut für Gärungsgewerbe in Berlin); den Zuwachs an Zellen bestimmen wir durch Trübungsmessung mit dem Extinktiometer von Moll und nur gelegentlich durch Auszählung der Zellen. Bei Kontrollversuchen ohne Bios-Zusatz zeigt unsere Hefe in Salz-Zucker-Lösung einen Zuwachs von etwa 40% in 5 Stdn., mit den Bios-Faktoren des Hefe-Kochsaftes in derselben Zeit dagegen einen Zuwachs von etwa 600%. Als Maß für die Anreicherung wählten wir die *Saccharomyces*-Einheit (S.-E.); hierunter verstehen wir jene Bios-Menge, die bei der Einwirkung auf 240  $\gamma$  Hefe unter unseren Versuchs-Bedingungen einen Zuwachs von 100% hervorruft.

<sup>12)</sup> Biochem. Journ. **23**, 1050 [1929].

<sup>13)</sup> Journ. physiol. Chem. **32**, 1094 [1928].

<sup>14)</sup> Journ. Amer. chem. Soc. **49**, 227 [1927], **51**, 2764 [1929], **53**, 4171 [1931], **54**, 3462 [1932]; Journ. biol. Chem. **83**, 315 [1929], **87**, 581 [1930].

<sup>15)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **195**, 81 [1931], **193**, 15 [1931], **223**, 189 [1934].

<sup>16)</sup> Anmerk. bei d. Korrekt.: Vergl. jedoch auch die inzwischen erschienene Mitteil. von R. J. Williams u. D. H. Saunders, Biochem. Journ. **28**, 1887 [1934], nach welcher bei der Reinigung der „Pantothensäure“ Fortschritte erzielt worden sind.

Zunächst wurde in Gemeinschaft mit Hrn. W. van Hasselt die Frage geprüft, ob Bios I in der Tat mit *meso*-Inosit identisch ist. Da Eastcott diesen Faktor nicht aus Hefe, sondern aus Tee-Blättern isoliert hat, war es nicht ganz auszuschließen, daß die entsprechende Substanz des Hefe-Kochsaftes z. B. ein Derivat des *meso*-Inosits wäre. Wir haben deshalb diesen Faktor aus Hefe-Plasmolysat unter verhältnismäßig milden Versuchs-Bedingungen isoliert; das erhaltene Krystallinat war jedoch ebenfalls identisch mit *meso*-Inosit. Unsere ganzen Erfahrungen über Bios I stehen mit jenen der kanadischen Forscher in erfreulicher Übereinstimmung.

Einen ungleich größeren Arbeits-Aufwand erforderte das Studium eines anderen Faktors<sup>17)</sup>, den wir im folgenden zunächst Bios II nennen wollen. Bios II ist in der Natur weit verbreitet, aber — wie wir jetzt wissen — nur in minimalen Konzentrationen. Wir arbeiteten zunächst mit Hefe-Kochsaft und anderen pflanzlichen Extrakten, stellten die Verarbeitung dieser Ausgangs-Materialien jedoch zurück, als wir in den Eidottern von Hühnern und im chinesischen Trocken-eigelb eine wesentlich günstigere Quelle fanden.

Die Arbeiten zur Isolierung dieses Bios-Wuchsstoffs erfolgten in Gemeinschaft mit Hrn. Dr. B. Tönnis, der die Zentner und Tonnen am Anfang des Weges ebenso ausgezeichnet beherrschte, wie die Gammas am Ende.

Anreicherungen, die bei den Auxinen durch die Äther-Löslichkeit und den Säure-Charakter spielend leicht zu erzielen sind, mußten bei Bios II, einem hydrophilen, amphoteren Stoff, mit großer Geduld erkämpft werden. Die einzelnen Schritte bieten chemisch nichts Besonderes: Ausfällung von Begleitstoffen, bzw. von wirksamen Fraktionen, mit Alkohol, Bleisalzen, Sublimat, Phosphorwolframsäure, Brom-pikrolonsäure, und die schon von anderen Autoren angewandte Adsorption an Tierkohle und Elution mit Aceton-Ammoniak. Die Kombination dieser Stufen führte zu einem Produkt mit einer Wirksamkeit von etwa 1 Milliarde S.-E. pro Gramm. Zum Schluß hat die fraktionierte Hochvakuum-Destillation einer basischen Ester-Fraktion weitergeholfen. Im ultravioletten Licht beobachtete man hierbei einen intensiv blau fluoreszierenden Vorlauf und eine grünblau fluoreszierende Hauptfraktion, die bei einem Vakuum von 0.001 mm zwischen 185—250° übergeht. Diese Hauptfraktion ist hochaktiv; ihre Lösung in Chloroform scheidet nach Zusatz von Petroläther prächtige, seidig glänzende Nadeln aus, die nach dem Umkrystallisieren einen Schmelzpunkt von 148° (unkorr.) und eine Wirksamkeit<sup>18)</sup> von 25—30 Milliarden S.-E. pro Gramm besitzen!

Wir haben somit ein Bios-II-Krystallinat erhalten, das an Wirksamkeit unseren Auxinen nicht nachsteht. Eindrucksvoll ist aber der Konzentrations-Unterschied in den Ausgangs-Materialien. Wir haben die Auxine aus Harn nach 40000-facher, aus Malz nach 300000-facher Anreicherung krystallisiert erhalten; dagegen mußte für die Gewinnung des Bios-II-Krystallinates aus Eigelb 3.1-millionenfach konzentriert werden. Wenn die Aktivität des in der Hefe selbst enthaltenen Wuchsstoffs in der gleichen Größenordnung liegt, so ist 1 g in etwa 36000 kg frischer Hefe enthalten; rechnet man mit einer Ausbeute von 10%, so müßten zur Gewinnung von 1 g Krystallinat etwa

<sup>17)</sup> Möglicherweise ist dieser Faktor identisch mit jenem, der von R. J. Williams, Journ. Amer. chem. Soc. 55, 2912 [1933], neuerdings „Pantotheinsäure“ genannt wird.

<sup>18)</sup> 1 mg des Krystallinats ist bei unserem Test in 400000 l Nährlösung noch deutlich nachzuweisen.

360 Tonnen Bäcker-Hefe verarbeitet werden; diese Zahlen erinnern sehr an die Radium-Darstellung aus Pechblende...

Wir besitzen bisher nur 580  $\gamma$  des überaus kostbaren Krystallisats, hoffen aber, aus den vorhandenen hochaktiven Rohprodukten in der nächsten Zeit einige Milligramme des Stoffes gewinnen zu können. Das hochaktive Rohprodukt enthielt Stickstoff, war aber frei von Schwefel und Phosphor, so daß für das Krystallisat das gleiche gelten dürfte. Da durch die Behandlung mit Methanol-Chlorwasserstoff aus der amphoteren Verbindung ein basischer Stoff entsteht, müssen im Ausgangsstoff eine basische Gruppe und ein Carboxyl vorliegen. Unter den Bedingungen der katalytischen Hydrierung wird die Aktivität nicht zerstört. Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten auf biologischem Wege ist im Gange; soweit wir sehen, dürfte das Molekulargewicht ziemlich niedrig sein.

Wir schlagen für unser Krystallisat in Anklang an Wildiers' Bezeichnung den Namen Biotin<sup>19)</sup> vor. Wenn mehrere Stoffe gleicher oder ähnlicher Aktivität gefunden werden, soll unser 1. Krystallisat die Bezeichnung Biotin-a erhalten.

Der sprachlich ungewöhnliche Name „Bios“ ist meist in Anführungszeichen geschrieben worden, und es hat nicht an Stimmen gefehlt, die seine Ausmerzung beantragten. Wir möchten dies schon aus historischen Gründen nicht vorschlagen; überdies ist die Bezeichnung für die Gruppe der Faktoren (Bios I = *meso*-Inosit, Bios II = Biotin u. s. f.) nach wie vor von praktischem Wert.

Um das Verständnis der Verhältnisse nicht zu erschweren, habe ich die Rolle des *meso*-Inosits und des noch als Rohprodukt vorliegenden Bios III bisher unbesprochen gelassen. Ihre Bedeutung wird rasch aus der folgenden Übersicht deutlich, in welcher die Wirkung der Saccharomyces-Einheit des krystallisierten Biotins und die Wirkung entsprechender Zusätze von Bios I und Bios III auf anschauliche Verhältnisse umgerechnet ist:

1 g Hefe gibt in einer Lösung von 42 g Glucose und 23 g anorganischen Salzen folgenden Zuwachs:

	nach 5 Stdn.	nach 10 Stdn.
1) ohne Bios-Zusatz.....	0.4 g	1—1.5 g
2) mit 4 g Bios I (Inosit) .....	0.4 g	1—1.5 g
3) mit 2 g Bios III (gereinigtes Prod.) .....	0.4 g	1—1.5 g
4) mit 4 g Bios I und 2 g Bios III.....	0.4 g	1—1.5 g
5) mit 0.00000167 g Biotin .....	1 g	4 g
6) mit 0.00000167 g Biotin .....	3 g	7 g
7) mit 0.00000167 g Biotin und 4 g Inosit .....		10 g
8) mit 0.00000167 g Biotin, 0.04 g Inosit und 2 g Bios III ..		14 g
9) mit 12.5 g Rückstand von Hefe-Kochsaft .....	6—7 g	19 g

Wie man sieht, sind die anderen Bios-Faktoren für sich allein unwirksam, erhöhen aber die Wirkung des Biotins beträchtlich, so haben wir z. B. im Versuch 8) nach 10 Stdn. einen Zuwachs von 1400%. Trotzdem bleibt die

<sup>19)</sup> Sollte es sich ergeben, daß unser aktives Krystallisat ein Lacton, ein Methyl-ester oder ein Lactam der zugrunde liegenden, physiologisch ähnlich aktiven Säure ist, so würde später die Bezeichnung Biotin zweckentsprechend für diese Säure verwendet werden.

Wirkung unserer Faktoren hinter jener des rohen Hefe-Kochsaftes zurück. Hierbei ist aber zu bedenken, daß die organischen Stoffe des Hefe-Kochsaftes, insbesondere wohl die organischen Stickstoffverbindungen, Nährstoffe darstellen, die die Wachstums-Bedingungen gegenüber der reinen Salz-Zucker-Lösung beträchtlich verbessern. Nicht unerwähnt darf bleiben, daß sich unsere Ergebnisse vorläufig nur auf die von uns verwendete Test-Hefe beziehen. Wie die Verhältnisse bei anderen Hefen und bei anderen Mikro-organismen liegen, darüber kann noch keine Aussage gemacht werden.

Und nun zum Schlusse die Frage, ob man Biotin als Phyto-hormon oder als Vitamin bezeichnen soll. Die Zufuhr des Biotins im Nährmilieu scheint zunächst für die Vitamin-Natur zu sprechen. Aber die strenge Scheidung zwischen Hormonen und Vitaminen ist in den letzten Jahren gefallen, ja man kann geradezu in der Zufuhr eines Vitamins eine natürliche Hormon-Therapie erblicken. Und wie ist es bei der Hefe? Vergessen wir nicht, daß die wilden Hefen die für ihr Wachstum erforderlichen Bios-Wuchsstoffe selbst synthetisieren können, während die Kultur-Hefen hierzu nicht mehr in ausreichendem Maße imstande sind. Wenn wir auch dieser Degenerations-Erscheinung die Entdeckung und Isolierung des Biotins verdanken, so legen wir doch für die biologischen Begriffe besser die Verhältnisse bei den wilden — d. h. den natürlichen — Hefen zugrunde und bezeichnen Biotin als ein Phyto-hormon. Da diese Fragen in erster Linie die Pflanzen-Physiologie betreffen, habe ich als Chemiker selbstverständlich das Urteil eines Fachmanns, und zwar das meines hochverehrten Kollegen F. A. F. C. Went, Wassenaar, eingeholt; er ist der Ansicht, daß aller Grund besteht, unser krystallisiertes Biotin als Phyto-hormon der Zellteilung anzusprechen.

---