

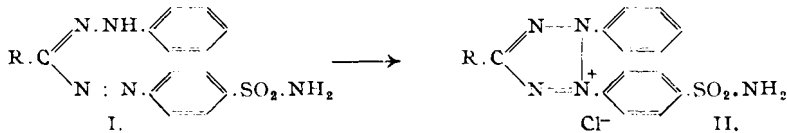
9. Dietrich Jerchel: Über Invertseifen, X. Mitteil.: Sulfonamidotetrazoliumsalze; Einwirkung auf die Glykolyse von Milchsäurebakterien.

[Aus d. Kaiser Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung Heidelberg,
Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 5. Dezember 1941.)

Beiträge zu dem Problem des Zusammenhanges von Konstitution und biologischer Wirkung auf dem Gebiet der Invertseifen brachten die Arbeiten von R. Kuhn und Mitarbeitern¹⁾. In der VII. Mitteilung²⁾ wurde von der Darstellung und den baktericiden Eigenschaften verschiedener 2,3-Diphenyl-5-alkyl-tetrazoliumsalze berichtet. Es war nun von Interesse, in diese Tetrazoliumverbindungen Sulfonamidogruppen einzuführen, um so zu Verbindungen zu kommen, die vielleicht eine besonders hohe baktericide Wirksamkeit besitzen würden. Ein sulfonamidhaltiges Formazan, die *N,N'*-Di-*[p*-sulfamido-phenyl]-formazylglyoxyssäure, wurde bereits durch A. Mossini³⁾ bekannt, der aber keine Oxydation zum Tetrazoliumsalz durchführte.

Zur Synthese der Sulfonamidotetrazoliumsalze (II) wurden zunächst die entsprechenden Formazane (I) nach H. von Pechmann und P. Runge⁴⁾ aus den Phenylhydrazonen der aliphatischen Aldehyde mit 1, 3, 6, 7 und 11 C-Atomen und diazotiertem Sulfanilsäureamid dargestellt. Der dehydrierende Ringschluß wurde hierauf, wie für die Darstellung der Diphenyl-tetrazoliumverbindungen²⁾ angegeben, mit Bleitetraacetat durchgeführt.



Die dargestellten Formazane zeichnen sich durch ihre große Neigung zur Krystallisation aus. Schon aus den Reaktionsgemischen fallen sie in ausgezeichneter Ausbeute krystallin an. Ihre Schmelzpunkte fallen mit zunehmender Kettenlänge.

Tafel I.

Schmelzpunkte der Formazane und Tetrazoliumsalze.

Substanz	Formazane	Tetrazoliumsalze
R = CH ₃	235°	198°
C ₃ H ₇	200°	179°
C ₆ H ₁₃	181°	147°
C ₇ H ₁₅	176°	142°
C ₁₁ H ₂₃	167°	135°

Aus den Formazanen entstanden in guten Ausbeuten die Phenylsulfonamidotetrazoliumsalze. Durch mehrfaches Umfällen aus Alkohol mit Äther konnten sie analysenrein erhalten werden. Die wäßrigen Lösungen der Verbindungen mit R ≥ C₆H₁₃ zeigen die von anderen Invertseifen her bekannten Eigenschaften.

¹⁾ I. Mitteil.: B. **73**, 1080 [1940]; IX. Mitteil.: O. Westphal, B. **74**, 1365 [1941].

²⁾ R. Kuhn u. D. Jerchel, B. **74**, 941 [1941].

³⁾ Ann. Chim. farmac. [3] **1940**, 24. Suppl. zu Farmacista ital. 8, Nr. 4 (C. **1940** II, 2602).

⁴⁾ Helv. chim. Acta **14**, 231 [1931].

Bei dem Wachstumshemmungsversuch an Milchsäurebakterien (*Streptobacterium plantarum*), den Herr Dr. E. F. Möller durchführte, ergab sich für 2-Phenyl-3-*p*-sulfamidophenyl-5-undecyl-tetrazoliumchlorid ein Wert gleicher Größenordnung wie für das entsprechende Diphenyl-undecyl-tetrazoliumchlorid. Beide Werte waren dem von Zephirol ähnlich.

Tafel 2.
Einwirkung auf Milchsäurebakterien.

Substanz	vollständige Hemmung	ungehemmtes Wachstum
2-Phenyl-3- <i>p</i> -sulfamidophenyl-5- <i>n</i> -undecyl-tetrazoliumchlorid.....	1 : 200 000	1 : 1 500 000
2.3-Diphenyl-5- <i>n</i> -undecyl-tetrazoliumchlorid	1 : 400 000	1 : 1 100 000
Zephirol	1 : 400 000	1 : 1 600 000

Frl. Dr. M. v. Czernucki-Hrebeljanowitsch prüfte am Hygienischen Institut der Universität Heidelberg (Prof. Dr. E. Rodenwald) die Wirksamkeit an Staphylokokken. Hier erwies sich, wie Tafel 3 zeigt, die Phenyl-sulfamidotetrazolium-Verbindung als viel weniger wirksam als das Diphenyl-tetrazoliumsalz.

Tafel 3.
Tötungsgrenzen und Wachstumsgrenzen.

Substanz	Tötungsgrenze	Wachstumsgrenze
2-Phenyl-3- <i>p</i> -sulfamidophenyl-5-undecyl-tetrazoliumchlorid.....	1 : 400	1 : 3 200
2.3-Diphenyl-5-undecyl-tetrazoliumchlorid..	1 : 38 400	1 : 409 600

Im Zusammenhang mit der Desinfektionswirkung schien es interessant, Einzelvorgänge des Bakterienlebens herauszugreifen und an ihnen die Wirksamkeit verschiedener Invertseifen zu studieren. Nach den Untersuchungen von Z. Baker, R. W. Harrison und B. F. Miller⁵⁾ waren Versuche an der Glykolyse von Bakterien erfolgversprechend. In der Tat ließ sich mit Hilfe der Glykolyse lebender Milchsäurebakterien ein einfaches Verfahren zum vergleichenden Test der Invertseifen ausarbeiten.

Herr Dr. E. F. Möller⁶⁾ stellte dazu eine von ihm gehaltene Kultur von *Streptobacterium plantarum* (Orla-Jensen 10 S) zur Verfügung. Es war zunächst nötig, eine größere Menge von kräftig glykolysierenden Bakterien zu züchten. Dazu wurden die bei 28° gezüchteten Bakterien täglich während 5 Tagen in neue Nährlösung übertragen. Die so erhaltenen Bakterien bildeten den Grundstock für die Versuchskultur. Von ihnen wurde auf eine größere Menge der Nährlösung überimpft und 4 Stdn. bei 38° gehalten. Vom Nährmedium getrennt, gewaschen und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, entstand die für den Glykolyseversuch nötige Bakterien-Suspension. Der Versuch selbst wurde im Warburg-Gefäß unter Stickstoff-Kohlensäure bei 28° im Thermostaten durchgeführt. Das Maß für die gebildete Milchsäure war die aus Natriumbicarbonat in Freiheit gesetzte Kohlensäuremenge.

⁵⁾ Journ. exp. Medicine 72, 249 [1940].

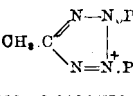
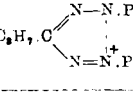
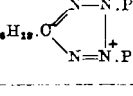
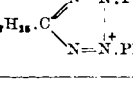
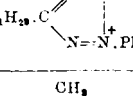
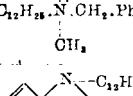
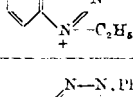
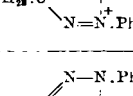
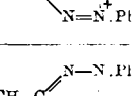
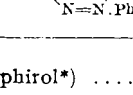
⁶⁾ Hrn. Dr. Möller ist zu danken für die freundliche Überlassung der Bakterienkultur und für wertvolle Ratschläge über die Kulturbedingungen.

Tafel 4. Hemmung der Glykolyse von Milchsäurebakterien.

Richtwerte zum Glykolyseverlauf (Mittelwerte aus 15 Versuchen):
 nach 10 Minuten 43 cmm CO₂ nach 30 Minuten 124 cmm CO₂

20 „ 87 „ „ 40 „ 177 „ „

Werte der Hemmung während 40 Min. in Prozenten: St. = Steigerung.

Substanz	Zeit in Min.	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000	1:10000000	
Ph = C ₆ H ₅ PhS = C ₆ H ₄ .SO ₂ .NH ₂		im Mittel:	im Mittel:	im Mittel:	im Mittel:	im Mittel:	im Mittel:	
	10	50	12	11	St. 11			
	20	48	St. 1	11	St. 8			
	30	59	55	11	4	St. 3		
	40	63		11	3			
	10		47	24	7			
	20		52	23	4			
	30	100	51.5	24	6	5		
	40		54	23	4			
	10			86	5	St. 5	St. 9	
	20			85	St. 1	St. 7	St. 3	
	30		100	82	83.5	2	7	St. 4
	40			81	0	1.5	St. 9	St. 2
	10			85	0	St. 13	0	
	20			81	0	St. 11	2	
	30		100	78	80.5	1	10	3
	40			78	2	St. 8	3	2
	10				43	St. 16	1	
	20				51	St. 14	St. 2	
	30			100	55	St. 8	10.5	0
	40				55	St. 4	0	0
	10				26	St. 20	St. 7	
	20				34	St. 21	St. 7	
	30			100	29	29	20	St. 8
	40				28	St. 20	St. 8	7.5
	10				34	St. 11	2	
	20				42	St. 10	St. 3	
	30			100	38	38	9	2
	40				38	St. 7	2	1
	10				71	St. 21	St. 10	
	20				67	St. 23	St. 17	
	30			100	65	67	24	St. 21
	40				64	St. 24	St. 19	St. 17
	10			58	31	St. 10		
	20			100	64	St. 10	St. 11.5	
	30				62	St. 13		
	40				60	St. 13		
	10	47	31	St. 3				
	20	46	29	0	St.			
	30	32	29	St. 10	4.5			
	40	38	25	St. 5				
Zephirol*)	10				50	St. 13	St. 6	
	20				53	St. 11	St. 2	
	30			100	57	St. 11	2	
	40				56	St. 13	2	

*) Die Werte für Zephirol wurden aus 15 Versuchen ermittelt. Jede andere Substanz war 2-mal an verschiedenen Tagen im Versuch. Die angeführten Zahlen sind die Mittelwerte dieser beiden Bestimmungen.

Tafel 4 zeigt die mit diesem Verfahren erhaltenen Ergebnisse. Um übereinstimmende Werte zu erhalten, mußte darauf geachtet werden, daß ständig mit etwa der gleichen Menge an Bakterien gearbeitet wurde. Durch Zählung, Trockengewichtsbestimmung und orientierenden Glykolyseversuch konnte dies zufriedenstellend erreicht werden. Für jeden Warburg-Versuch wurden etwa 5 Milliarden Zellen (Zählung in der Thoma-Zählkammer) benötigt; das entsprach einem Trockengewicht von im Durchschnitt 6 mg. Diese Bakterienmenge ergab im Glykolyseversuch die gewünschte Milchsäuremenge (s. dazu die Richtwerte der Kohlensäurebildung auf Tafel 4). Als Substrat wurde Glucose verwendet. Wurden mehr Bakterien verwendet und damit diese Werte gesteigert, so wirkten die Invertseifen weniger hemmend, bei weniger Bakterien gleichlaufend stärker hemmend. Jeder Versuch, während 40 Min. durchgeführt, ergab ein gradliniges Ansteigen sowohl der CO_2 -Werte der normalen Glykolyse als auch der Werte der gehemmten Glykolyse. In der Tafel sind die Werte der Hemmung nach jeweils 10 Min. in Prozenten und die sich daraus ergebenden Mittelwerte verzeichnet.

Die Versuche wurden durchgeführt mit den in der vorliegenden Mitteilung beschriebenen verschieden kettenlangen Sulfamidotetrazoliumsalsen sowie mit einigen Invertseifen anderer Typen. Besonders deutlich wird die Abhängigkeit der Hemmungswerte von der Kettenlänge des Alkylrestes der Invertseife. Im Gegensatz zu den bisher geübten Methoden (Wachstumshemmungsversuche, Tötungsversuche) ist durch den Test an der Glykolyse von Bakterien die Möglichkeit gegeben, auch weniger wirksame Invertseifen vergleichend zu prüfen. Allgemein steigern ein wenig kleinere Konzentrationen als die, bei denen Hemmung erfolgt, die Glykolyse. Weiterhin ergibt sich, daß Invertseifen etwa gleicher Kettenlänge aber verschiedenen Typs größenordnungsmäßig die gleiche Wirkung bei der bakteriellen Glykolyse zeigen.

Hrn. W. Schulz habe ich für seine ausgezeichnete Unterstützung besonders bei den Glykolyseversuchen zu danken.

Beschreibung der Versuche.

N-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-methyl-formazan (I, $\text{R} = \text{CH}_3$).

27 g ($\frac{2}{10}$ Mol) Phenylhydrazon des Acetaldehyds wurden mit dem Diazoniumsalz aus 34.4 g Sulfanilamid unter Zusatz von 60 g kryst. Natriumacetat in 400 ccm Äthanol bei 0—10° gekuppelt. Das zu erwartende Formazan krystallisierte aus dem Reaktionsgemisch in tiefroten Stäbchen in quantitativer Ausbeute aus. Einmal aus Äthanol krystallisiert, hinterblieben 41.5 g analysenreines Formazan vom Schmp. 235° (Kofler).

3.900 mg Sbst.: 7.570 mg CO_2 , 3.05 mg H_2O . — 3.119 mg Sbst.: 0.607 ccm N_2 (21°, 754 mm).

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$ (317.1). Ber. C 52.98, H 4.77, N 22.07. Gef. C 52.94, H 4.88, N 22.34.

2-Phenyl-3-*p*-sulfamidophenyl-5-methyl-tetrazoliumchlorid
(II, $\text{R} = \text{CH}_3$).

10 g *N*-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-methyl-formazan wurden in trockenem Chloroform mit 16 g Bleitetraacetat versetzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie für das 2.3-Diphenyl-tetrazoliumchlorid in der früheren Arbeit²⁾ angegeben wurde. Es wurde ein blaß gelbliches, außer-

ordentlich hygroskopisches Pulver erhalten. Die Reinigung zur Analyse erfolgte durch mehrfaches Ausfällen aus Methanol mittels Äthers. Schmp. 198° (unscharf, Kofler).

4.198 mg Sbst.: 7.30 mg CO₂, 1.50 mg H₂O. — 3.496 mg Sbst.: 6.09 mg CO₂, 1.29 mg H₂O. — 2.050 mg Sbst.: 0.359 ccm N₂ (22°, 758 mm). — 4.205 mg Sbst.: 1.660 mg AgCl.
C₁₄H₁₄O₂N₂ClS (351.6). Ber. C 47.79, H 4.01, N 19.91, Cl 10.09.
Gef. „ 47.53, 47.51, „ 4.16, 4.13, „ 20.21, „ 9.66.

N-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-*n*-propionyl-formazan
(I, R = C₃H₇).

60 g Phenylhydrazon des Butyraldehyds (Sdp.₁₂ 154—158°) wurden unter den beschriebenen Bedingungen mit dem Diazoniumsalz aus 64 g Sulfanilamid zur Umsetzung gebracht. Nach einmaliger Krystallisation wurden 80 g in prächtigen roten Nadelchen krystallisierendes Formazan vom Schmp. 200° (Kofler) erhalten.

3.940 mg Sbst.: 8.075 mg CO₂, 2.000 mg H₂O. — 1.860 mg Sbst.: 0.325 ccm N₂ (23°, 757 mm).

C₁₆H₁₆O₂N₂S (345.15). Ber. C 55.63, H 5.55, N 20.29.
Gef. „ 55.89, „ 5.68, „ 20.07.

2-Phenyl-3-*p*-sulfamidophenyl-5-*n*-propyl-tetrazoliumchlorid
(II, R = C₃H₇).

11.5 g *N*-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-propionyl-formazan wurden unter den bekannten Bedingungen mit der ber. Menge an Bleitetraacetat in Reaktion gebracht. Es wurden 10 g eines gelblichen Pulvers erhalten. Aus Methanol mittels Äthers mehrfach gefällt, war es analysenrein und schmolz bei 179° (Kofler).

1.885 mg Sbst.: 0.299 ccm N₂ (22°, 759 mm). — 3.768 mg Sbst.: 1.380 mg AgCl. — 2.685 mg Sbst.: 0.985 mg AgCl.

C₁₆H₁₆O₂N₄ClS (379.6). Ber. N 18.44, Cl 9.34. Gef. N 18.33, Cl 9.06, 9.08.

N-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-*n*-hexyl-formazan
(I, R = C₆H₁₃).

Aus 41 g *n*-Heptylaldehyd-phenylhydrazon und dem Diazoniumchlorid aus 35 g Sulfanilamid wurde in quantitativer Ausbeute das Formazan erhalten. Die aus Äthanol in tiefroten Krystallen erhaltene Verbindung hatte den Schmp. 181° (Kofler).

3.845 mg Sbst.: 8.360 mg CO₂, 2.275 mg H₂O. — 2.944 mg Sbst.: 0.465 ccm N₂ (23°, 758 mm).

C₁₉H₂₆O₂N₂S (387.2). Ber. C 58.88, H 6.51, N 18.08.
Gef. „ 59.30, „ 6.62, „ 18.17.

2-Phenyl-3-*p*-sulfamidophenyl-5-*n*-hexyl-tetrazoliumchlorid
(II, R = C₆H₁₃).

5 g *N*-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-hexyl-formazan, der Reaktion mit 6 g Bleitetraacetat in Chloroform unterworfen, lieferten 4.5 g eines gelblichen pulverigen Tetrazoliumsalzes. Die Reinigung erfolgte durch mehrfaches Umfällen. Schmp. 147°.

3.002 mg Sbst.: 0.428 ccm N₂ (21°, 756 mm). — 3.410 mg Sbst.: 1.145 mg AgCl. — 2.870 mg Sbst.: 0.965 mg AgCl.

C₁₉H₂₄O₂N₄ClS (421.6). Ber. N 16.60, Cl 8.41. Gef. N 16.47, Cl 8.31, 8.32.

N-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-*n*-heptyl-formazan
(I, R = C₇H₁₅).

32 g Phenylhydrazon des *n*-Octylaldehyds vom Sdp.₁₂ 200° wurden mit dem Diazoniumsalz aus 28 g Sulfanilamid umgesetzt. So wurden 55 g krystallisierten Rohproduktes erhalten. Aus Äthanol krystallisiert, hatte das Formazan den Schmp. 176° (Kofler).

3.760 mg Sbst.: 8.280 mg CO₂, 2.240 mg H₂O. — 3.865 mg Sbst.: 8.510 mg CO₂, 2.215 mg H₂O.

C₂₀H₂₇O₂N₅S (401.2). Ber. C 59.82, H 6.78.
Gef. „ 60,06, 60,05, „ 6,67, 6,40.

2-Phenyl-3-*p*-sulfamidophenyl-5-*n*-heptyl-tetrazoliumchlorid
(II, R = C₇H₁₅).

Der dehydrierende Ringschluß von 10 g *N*-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-heptyl-formazan mittels Bleitetraacetats ergab 9 g Tetrazoliumsalz, welches nach 3-maligem Umfällen analysenrein war und den Schmp. 142° (Kofler) hatte.

2.010 mg Sbst.: 0.281 ccm N₂ (20°, 756 mm). — 3.080 mg Sbst.: 1.020 mg AgCl.

C₂₀H₂₆O₂N₅ClS (435.7). Ber. N 16.07, Cl 8.14. Gef. N 16.20, Cl 8.19.

N-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-*n*-undecyl-formazan
(I, R = C₁₁H₂₃).

Die Umsetzung von 40 g *n*-Dodecyl-phenylhydrazon mit der Diazonium-Verbindung aus 25.3 g Sulfanilamid führte in der ber. Ausbeute zu dem aus dem Reaktionsgemisch krystallin ausfallenden Formazan. Aus Äthanol wurde es in mikroskopisch kleinen Nadeln vom Schmp. 167° (Kofler) von kräftig roter Farbe erhalten.

3.900 mg Sbst.: 9.02 mg CO₂, 2.685 mg H₂O. — 3.700 mg Sbst.: 0.487 ccm N₂ (2 2°, 753 mm).

C₂₄H₃₅O₂N₅S (457.3). Ber. C 62.98, H 7.71, N 15.31.
Gef. „ 63,08, „ 7,70, „ 15,19.

2-Phenyl-3-*p*-sulfamidophenyl-5-*n*-undecyl-tetrazoliumchlorid
(II, R = C₁₁H₂₃).

Mittels 6g Bleitetraacetats wurden 5g *N*-Phenyl-*N'*-*p*-sulfamidophenyl-*C*-undecyl-formazan in quantitativer Ausbeute in die Tetrazoliumverbindung verwandelt. Zur Analyse wurde die Lösung in Äthanol mit Tierkohle behandelt und mit Äther mehrfach ausgefällt. So wurde ein gelbliches Pulver vom Schmp. 135° erhalten.

3.005 mg Sbst.: 0.372 ccm N₂ (20°, 740 mm). — 4.800 mg Sbst.: 1.345 mg AgCl.

C₂₄H₃₄O₂N₅ClS (491.7). Ber. N 14.24, Cl 7.21. Gef. N 14.04, Cl 6.93.

Durchführung der Glykolyseversuche.

Kulturbedingungen: Zur Verfügung stand eine Glucose-Mangan-Bouillon-Kultur von *Streptobacterium plantarum* (Orla-Jensen 10 S). Hiervon wurde

eine Öse in 10 ccm einer von Dr. E. F. Möller angegebenen Nährlösung⁷⁾ überimpft und 2 Tage bei 28° gezüchtet. Von der entstandenen Bakteriensuspension wurden 0.5 ccm in 10 ccm frische Nährlösung übertragen. Aus der nach 24 Stdn. entstandenen schleimigen Kultur wurden wiederum 0.5 ccm in 10 ccm Nährlösung gegeben und dies über 5 Tage fortgesetzt. Schließlich wurden am Versuchstag 5 ccm dieser vornehmlich aus jungen Bakterien bestehenden Kultur in 100 ccm Nährlösung übertragen und diese während 4 Stdn. im Brutschrank bei 38° gehalten. Nur unter diesen Bedingungen erhielt man eine genügende Menge glykolytisch hochaktiver Bakterien.

Versuche im Warburg-Gefäß: Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren mit hoher Tourenzahl von der Nährlösung getrennt, einmal mit physiologischer Kochsalzlösung in der Zentrifuge gewaschen und in 11 ccm der gleichen Salzlösung suspendiert. Davon wurden zur orientierenden Bestimmung der glykolytischen Aktivität 1 ccm zusammen mit 0.1 ccm Glucose-Lösung (10 mg), 1.6 ccm Krebs-Ringer-Lösung⁸⁾ und 0.3 ccm dest. Wasser in einem Warburg-Gefäß unter Stickstoff-Kohlensäure (95% N₂, 5% CO₂) bei 28° geschüttelt. Nach 15 Min. hatte man sich so von den Anfangswerten der Milchsäure-Bildung überzeugt. Für den Hauptversuch wurde nun entsprechend verdünnt oder auch durch erneutes Zentrifugieren konzentriert. (Siehe dazu die Richtwerte, Tafel 4). Dabei war zu berücksichtigen, daß die Aktivität der Suspension im Verlauf der Zeit abnahm.

Tafel 5. Glykolyse von Milchsäurebakterien.

Zeit in Min.	nach 30 Min. in physiol. Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur	nach 120 Min.	nach 180 Min.
10	45	38	28
20	78	80	44
30	106	92	60 cmm CO ₂

Für den Hauptversuch war die Füllung des Gefäßes ebenso vorgenommen worden, wie für den Orientierungsversuch. Zum Unterschied davon wurde der Ansatz des Gefäßes mit 0.3 ccm der Lösung der zu prüfenden Invertseife gefüllt und dieser nach dem Konstantwerden der Temperatur des Gefäßes in den Hauptraum entleert. Die Kohlensäureentwicklung wurde während 40 Min. beobachtet.

⁷⁾ 500 ccm Hefekochsaft aus 125 g Löwenbräu-Hefe, 100 ccm Salzlösung bestehend aus: 0.5% *prim.* Kaliumphosphat nach Sörensen, 0.75% *sek.* Natriumphosphat nach Sörensen, 8.24% kryst. Natriumacetat, 3% Ammoniumsulfat, 20 ccm Caseinhydrolysat (10-proz. bezogen auf Casein), 320 ccm Wasser, 12.5 g Nährbouillon Standard I der Firma Merck, Darmstadt, 20 g Glucose, 20 mg MnCl₂ + 4H₂O, 100 mg Cysteinhydrochlorid von Hoffmann-La Roche & Cie.

⁸⁾ H. A. Krebs u. K. Henseleit, Ztschr. physiol. Chem. **210**, 36 [1932].