

155. Ernst Friedrich Möller und Leonhard Birkhofer: Konstitutionsspezifität der Nicotinsäure als Wuchsstoff bei *Proteus vulgaris* und *Streptobacterium plantarum*.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 3. August 1942.)

Die Wuchsstoffnatur der Nicotinsäure wurde im Jahre 1937 fast gleichzeitig durch B. C. J. G. Knight¹⁾ bei *Staphylococcus aureus* und durch J. H. Mueller²⁾ bei *Clostridium diphtheriae* erkannt. Noch in demselben Jahre zeigten Elvehjem und Mitarbeiter³⁾, daß sie bei Hunden als Antipellagrafaktor wirkt. Es erhob sich sofort, wie bei anderen Vitaminen, die Frage der Konstitutionsspezifität. Die Elvehjemsche Schule⁴⁾ fand, daß beim Hund nur solche Derivate gut wirksam sind, die wie z. B. Amide und Ester leicht in Nicotinsäure übergehen können. Kernsubstituierte und hydrierte Abkömmlinge sowie die isomeren Pyridincarbonsäuren waren unwirksam. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den verschiedenen Bakterien, für die sich Nicotinsäure als notwendig zum Wachstum erwiesen hat.

B. C. J. G. Knight und H. Mc Ilwain⁵⁾ prüften einige Nicotinsäure-Derivate bei *Staphylococcus aureus*, Untersuchungen, die M. Landy⁶⁾ auf weitere Pyridin-Derivate ausdehnte. Dorfman, Koser, Saunders und Mitarbeiter⁷⁾ untersuchten die Konstitutionsspezifität für *Bacterium dysenteriae*. Für *Proteus vulgaris*, an dem P. Fildes⁸⁾ nur einige Nicotinsäure-Derivate prüfte, liegen umfangreiche Untersuchungen von A. Lwoff und A. Querido⁹⁾ sowie von M. Pelczar jr. und J. R. Porter¹⁰⁾ vor. Es ist wahrscheinlich, daß auch mit *Lactobacillus arabinosis* solche Versuche von Snell¹¹⁾ ausgeführt worden sind.

Die eigenen Untersuchungen haben wir mit *Proteus vulgaris* (*Pr. v.*) begonnen, um zunächst an einem bekannten Testobjekt bisher noch nicht geprüfte Stoffe mit den bereits von den genannten Autoren geprüften vergleichen zu können. Es lag nahe, daß wir auch bei *Streptobacterium plantarum* (*Sbm. pl.*), dessen Nährstoffbedarf durch den einen von uns¹²⁾ ¹³⁾ eingehend

¹⁾ Nature [London] **139**, 628 [1937]; Biochem. Journ. **31**, 731 [1937].

²⁾ Journ. Bacteriol. **34**, 429 [1937]; Journ. biol. Chem. **120**, 219 [1937].

³⁾ C. A. Elvehjem, R. J. Madden, F. M. Strong u. D. W. Woolley, Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 1767 [1937]; Journ. biol. Chem. **123**, 137 [1938].

⁴⁾ D. W. Woolley, F. M. Strong, R. J. Madden u. C. A. Elvehjem, Journ. biol. Chem. **124**, 715 [1938].

⁵⁾ Biochem. Journ. **32**, 1241 [1938]; B. C. J. G. Knight, Biochem. Journ. **31**, 731 [1937].

⁶⁾ Nature [London] **142**, 618 [1938]; Proceed. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 504 [1938].

⁷⁾ A. Dorfman, St. A. Koser u. F. Saunders, Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 2004 [1938]; A. Dorfman, St. A. Koser, H. R. Reams, K. F. Swingle u. F. Saunders, Journ. infect. Diseases **65**, 163 [1939].

⁸⁾ Brit. Journ. exp. Pathol. **19**, 239 [1938].

⁹⁾ Compt. rend. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **130**, 1569 [1938].

¹⁰⁾ Journ. Bacteriol. **39**, 429 [1940]; s. auch Fußn. 27).

¹¹⁾ Die Arbeit von E. E. Snell u. L. D. Wright, Journ. biol. Chem. **139**, 675 [1941] über Nicotinsäure-Bestimmung mit *Lactobacillus arabinosis* war uns leider auch als Referat nicht zugänglich.

¹²⁾ E. F. Möller, Angew. Chem. **53**, 204 [1940].

¹³⁾ E. F. Möller u. K. Schwarz, B. **74**, 1612 [1941].

studiert worden ist, versucht haben, die Nicotinsäure durch verwandte Verbindungen zu ersetzen. Unsere Ergebnisse (Tafel 1 und 2) bestätigen im allgemeinen die bereits für Säugetiere und andere Bakterien gefundene hohe Konstitutionsspezifität der Nicotinsäure.

Tafel I.

Spezifität von Nicotinsäure bei *Proteus vulgaris* (Vergleichswerte bei *B. dysenteriae* und beim Hund).

Nr.	Substanz	<i>Proteus vulgaris</i> (2993) (pH ~ 7.0) (1 1/2 Tage)		<i>Prot. vulg.</i> X 19 Syrie (pH 7.5)	<i>B. dysenteriae</i>	Hund
		a)	b)	a) ^{g)}	c) ⁷⁾	d) ⁴⁾
1	Nicotinsäure	2.1 × 10 ⁻⁸	0.63 bis 1.26 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁸	+++ + 1 × 10 ⁻⁷	+
2	Nicotinsäuremethylester .	3.7 × 10 ⁻⁹	2.0 × 10 ^{-6 e)}		+++ + 1 × 10 ⁻⁷	
3	Nicotinsäureamid	2.1 × 10 ⁻⁸	1.26 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁸	+++ + 1 × 10 ⁻⁷	+
4	Nicotinsäureamidjod- methylat				—	
5	Coramin	0.8 × 10 ⁻⁴	0.64 × 10 ^{-3 c)}	1 × 10 ⁻⁵		+
6	Pyridin-β-sulfonsäure	0.29 × 10 ⁻⁴	0.37 × 10 ⁻²	1 × 10 ⁻⁵	— bis 1 × 10 ⁻⁴	
7	Pyridin-β-sulfonsäure- amid	1.1 × 10 ⁻³	> 0.31 × 10 ⁻¹	1 × 10 ⁻⁵		
8	Pyridin-β-sulfonsäure- diäthylamid	2.7 × 10 ⁻⁴	1.1 × 10 ^{-3 f)}			
9	Picolinsäuremethylester ..	schwankende Werte < 1.24 × 10 ⁻³ 4.37 × 10 ^{-3 e)}		> 10 ⁻⁴ (freie Säure)	—	—
10	6-Methyl-nicotinsäureamid	< 0.61 × 10 ⁻⁴	0.49 × 10 ⁻²		— bis 1 × 10 ⁻⁴ (freie Säure)	
11	2,6-Dimethyl-nicotin- säureamid	> 3.6 × 10 ⁻²				
12	2-Acetyl-nicotinsäure	> 1.6 × 10 ⁻²				
13	Nicotin (Merck, puriss.) .	1.6 × 10 ⁻⁸	0.51 × 10 ⁻³			
14	Pyrazin-carbonsäure-(3) .	> 1.1 × 10 ⁻²			—	
15	Pyrazin-dicarbonsäure- (2,3)	> 1.6 × 10 ⁻²			—	
16	Thiazol-carbonsäure-(5) ..	1.6 × 10 ⁻⁴	2.1 × 10 ⁻²		++ + 1 × 10 ⁻³	

a) Minimales (eben sichtbares) Wachstum, Konzentration in Mol/l.

b) Maximales Wachstum, Konzentration in Mol/l.

c) +++ = starkes, ++ = mittleres, -- = kein Wachstum.

d) + = positive, -- = negative Wirkung einer Gabe von 2 × 10⁻⁵ Molen.

e) Tieferes Maximum als bei Nicotinsäure. Bei höherer Konzentration Hemmung.

f) In einem 2. Versuch wurde ein tieferes Maximum bei 1.1 × 10⁻² mol erreicht, das bis 2.3 × 10⁻² mol nicht mehr anstieg.

Die Nicotinsäure (I 1, II 1)¹⁴⁾ ruft in einer Konzentration von 0.63 bis 1.4 × 10⁻⁶ mol bei *Pr. v.* und von 5 × 10⁻⁷ mol bei *Sbm. pl.* optimales Wachstum hervor. Wir finden in Übereinstimmung mit Fildes⁸⁾ sowie mit Lwoff und Querido⁹⁾, daß an *Pr. v.* (I 3, II 4, 5) das Amid in der gleichen Konzentration wie die freie Säure wirkt. Dasselbe gilt für *Sbm. pl.* Interessanterweise ist die Wirkung des Methylesters (I 2, II 2, 3) bei *Pr. v.* pH-abhängig: Während

¹⁴⁾ I 1 bedeutet Tafel I, Substanz Nr. 1; II 1 Tafel II, Substanz Nr. 1 usw.

Tafel II.

Wuchsstoffwirkung (2 Tage) bei *Proteus vulgaris* (3056) und *Streptobacterium plantarum* (10 S, O. J.)^{a)}.

Nr.	Name der Substanz	<i>Proteus vulgaris</i> (pH 7.2)	<i>Proteus vulgaris</i> (pH 7.8—8.1)	<i>Sbm. pl.</i> (pH 6.6)
1	Nicotinsäure	3.2×10^{-8} 1.1×10^{-6}	1.8×10^{-8} 1.4×10^{-6}	4.0×10^{-8} 4.9×10^{-7}
2	Nicotinsäure-methylester	3.7×10^{-8} 1.2×10^{-6}	0.73×10^{-8} 2.2×10^{-7}	3.0×10^{-7} 1.2×10^{-6}
3	Nicotinsäure-methylester ^{b)} ..	3.7×10^{-8} 1.2×10^{-6}	0.50×10^{-8} 2.2×10^{-7}	3.0×10^{-7} 2.4×10^{-6}
4	Nicotinsäureamid	4.1×10^{-8} 1.4×10^{-6}	1.1×10^{-8} 1.4×10^{-6}	4.1×10^{-8} 6.5×10^{-7}
5	Nicotinsäureamid ^{b)}	4.1×10^{-8} 1.4×10^{-6}	1.1×10^{-8} 0.65×10^{-6}	6.5×10^{-8} 6.5×10^{-7}
6	Nicotinsäureamid-jodmethylat	2.4×10^{-4} 4.5×10^{-3}	7.6×10^{-4} 2.1×10^{-2}	2.5×10^{-4} nicht prüfbar
7	Coramin	3.5×10^{-4} (1.9×10^{-3}) c)	5.9×10^{-8} 0.74×10^{-5}	5.6×10^{-4} 5.6×10^{-3} o)
8	Cozymase	3.7×10^{-7} 0.74×10^{-5}	5.9×10^{-8} 0.74×10^{-5}	2.5×10^{-7} 1.8×10^{-6}
9	Cozymase ^{b)}		5.9×10^{-8} 1.8×10^{-6}	2.5×10^{-7} 1.8×10^{-6}
10	Pyridin- β -sulfonsäure	1.3×10^{-2} 1.3×10^{-1}	1.6×10^{-3} (6.3×10^{-3}) e)	1.3×10^{-2} d) (6.4×10^{-2}) d)
11	Pyridin- β -sulfamid	1.3×10^{-2} nicht prüfbar	4.4×10^{-2} nicht prüfbar	schwankende Werte
12	Pyridin- β -sulfamid ^{b)}	1.3×10^{-2} nicht prüfbar	4.4×10^{-2} nicht prüfbar	
13	Pyridin- β -sulfamidjodmethylat	3.3×10^{-3} nicht prüfbar	3.3×10^{-3} nicht prüfbar	$> 2.7 \times 10^{-4}$ nicht prüfbar
14	S-Coramin	$> 1.8 \times 10^{-2}$ nicht prüfbar	1.8×10^{-2} nicht prüfbar	$> 1.8 \times 10^{-2}$ nicht prüfbar
15	Picolinsäure	$> 2.7 \times 10^{-3}$ geht in Hemm. über	$> 2.7 \times 10^{-3}$ geht in Hemm. über	$> 2.7 \times 10^{-3}$ geht in Hemm. über
16	α -Picolin	(3.6×10^{-3}) f) geht in Hemm. über	(0.86×10^{-3}) f) geht in Hemm. über	$> (2.7 \times 10^{-2})$ f) geht in Hemm. über
17	Nicotin (gereinigt, s. S. 1118).	1.2×10^{-4} 2.0×10^{-3}	6.2×10^{-5} 1.1×10^{-3}	1.1×10^{-3} 4.2×10^{-3}
18	Thionicotinsäureamid	$< 1.2 \times 10^{-6}$ 3.6×10^{-5}	2.8×10^{-7} 1.8×10^{-5}	5.9×10^{-6} 1.9×10^{-5}
19	Thionicotinsäureamid ^{b)}	$< 1.2 \times 10^{-6}$ 7.2×10^{-6}	4.5×10^{-7} 7.2×10^{-5}	5.9×10^{-6} 3.9×10^{-5}
20	Thiopicolinsäureamid	2.2×10^{-3} nicht prüfbar	? ?	$> 5.8 \times 10^{-4}$ d) nicht prüfbar

a) Die zu jeder Substanz gehörenden oberen Zahlen stellen Konzentrationen in Mol/l für halb-optimales Wachstum dar; die unteren eingerückten Zahlen die entsprechenden Werte für optimales Wachstum.

b) Substanz erst nach Sterilisieren des Grundmediums unter sterilen Bedingungen zugegeben.

c) Maximum nur 80% des Nicotinsäure-Maximums.

d) Schwankende Werte.

e) Nur 60% des Nicotinsäure-Maximums.

f) Nur 30% des Nicotinsäure-Maximums.

Tafel II (Fortsetzung).

Nr.	Name der Substanz	<i>Proteus vulgaris</i> (pH 7.2)	<i>Proteus vulgaris</i> (pH 7.8—8.1)	<i>Sbm. pl.</i> (pH 6.6)
21	Thiopicolinsäureamid ^{b)}	2.2×10^{-3} nicht prüfbar	?	
22	Thiazolcarbonsäure ^{g)}	1.2×10^{-3} (5.0×10^{-3}) ^{b)}	2.6×10^{-3} (0.97×10^{-2}) ^{b)}	1.3×10^{-3} (1×10^{-2}) ^{b)}
23	Chinolin- β -carbonsäure	$>1.2 \times 10^{-2}$ ⁱ⁾ geht in Hemm. über		$>1.2 \times 10^{-2}$ geht in Hemm. über
24	Chinolin- α -carbonsäure	$>1.2 \times 10^{-2}$ ⁱ⁾ geht in Hemm. über		$>0.6 \times 10^{-2}$ geht in Hemm. über

^{g)} Werte nach 4 Tagen.

^{b)} Nur 75% des Nicotinsäuremaximums.

ⁱ⁾ Werte bei pH 7.5.

bei pH 7—7.2 gleich viel Ester wie Nicotinsäure für optimales Wachstum benötigt wird, reicht bei pH 7.8—8.1 bereits etwa der 5. Teil aus¹⁵⁾. Bei *Sbm. pl.* dagegen ist, unabhängig vom pH, die für optimales Wachstum benötigte Menge an Methylester 2.5 bis 5-mal größer als die an Nicotinsäure. Cozymase (II 8, 9), die bei *Staphylococcus aureus*⁸⁾ und *Pr. v. (X 19 Syrie)*⁹⁾ dieselbe molare Wirksamkeit wie Nicotinsäure zeigte, verhält sich ebenso bei *Pr. v. (3056)*, während sie bei *Sbm. pl.* etwa nur so aktiv ist wie der Methylester¹⁶⁾. Dorfman und Mitarbeiter¹⁷⁾ fanden Cozymase, und vor allem Codehydrase II sogar größenordnungsmäßig unwirksamer bei *Bacterium dysenteriae*.

Nach St. A. Koser, S. Berkman und A. Dorfman¹⁸⁾ bestehen hinsichtlich der Notwendigkeit von Nicotinsäure oder Nicotinsäureamid bei den verschiedenen Bakterien alle Übergänge, von solchen, die nur Nicotinsäureamid verwenden können, über diejenigen, bei denen Nicotinsäure und Nicotinsäureamid gleichwertig sind, bis zu den interessanten Organismen (z. B. *Pasteurella suisseptica*), die nur mit Nicotinsäure, nicht mit ihrem Amid, gedeihen können. Aus dem bis dahin unbekanntem Verhalten, daß ein kleineres Bruchstück eines Wirkstoffes aktiver ist als die nächst höhere Zwischenstufe, ziehen die genannten Autoren den Schluß, daß Nicotinsäure ment nur zum Aufbau der bekannten Codehydrasen, sondern auch zur Synthese weiterer bisher noch unbekannter Cofermente dient. Bis jetzt wird offenbar immer die stillschweigende Voraussetzung gemacht, Nicotinsäureamid sei die erste Zwischenstufe beim Aufbau der Codehydrasen aus der Nicotinsäure. Es ist aber theoretisch auch denkbar, daß manche Bakterien die Verknüpfung mit der Ribose mit freier Nicotinsäure ausführen, und daß

¹⁵⁾ Auch die Atmung und Methylenblau-Entfärbung durch *B. dysenteriae* (mit Glucose als Substrat) wird durch Nicotinsäuremethylester in kleinerer Konzentration als durch Nicotinsäure gefördert, s. F. Saunders, A. Dorfman u. St. A. Koser, Journ. biol. Chem. **138**, 69 [1941].

¹⁶⁾ Cozymase darf nicht in dem alkalischen *Proteus*-Nährboden mitsterilisiert werden, da sie dabei zerstört wird (s. Tafel II, Substanzen 8, 9).

¹⁷⁾ A. Dorfman, St. A. Koser, M. K. Horwitt, S. Berkman u. F. Saunders, Proceed. Soc. exp. Biol. Med. **43**, 434 [1940].

¹⁸⁾ Proceed. Soc. exp. Biol. Med. **47**, 504 [1941].

die Amidierung erst in einem späteren Reaktionsstadium erfolgt. Die höhere Wirksamkeit des Methylesters bei einer weiteren Gruppe von Bakterien könnte vielleicht damit erklärt werden, daß die Ribosidbildung in diesem Fall am leichtesten mit dem Ester verläuft. Bei solchen Bakterien schließlich, die erst bei höherer Codehydrase-Konzentration gedeihen, ist auch eine Erschwerung der Resorption in Erwägung zu ziehen. Langsamere Aufnahme phosphorylierter Stoffe durch Mikroorganismen, besonders durch Hefe, ist ja häufig beobachtet worden.

Es sei in diesem Zusammenhang noch erwähnt, daß *Haemophilus parainfluenzae* nur fertige Codehydrasen verwerten kann, eine Tatsache, die A. Lwoff und M. Lwoff¹⁹⁾ schon ein Jahr vor der Entdeckung der Wuchsstoffwirkung von Nicotinsäure festgestellt hatten. Da nur bekannt ist, daß dieses Bacterium nicht in Anwesenheit von Nicotinsäure oder ihrem Amid gedeiht, wäre es interessant zu prüfen, ob vielleicht Nicotinsäure-(amid)-ribosephosphorsäure bereits bei den Influenzabakterien wirksam ist, oder ob es andere Bakterien gibt, bei denen ein solcher Fall vorliegt.

Außer einigen weiteren funktionellen Derivaten (I 4, 5; II 6, 7) der Nicotinsäure untersuchten wir 6-Methyl-nicotinsäureamid, 2,6-Dimethyl-nicotinsäureamid, 2-Acetyl-nicotinsäure (I 12), Chinolin- β - und α -carbon-säure (II 23, 24), Verbindungen, die bisher noch nicht bei Mikroorganismen geprüft wurden. Ihre schwache bzw. negative Wirkung erweitert die schon bekannten Befunde an anderen substituierten Nicotinsäuren.

Die Isomeren der Nicotinsäure sind in der Literatur als unwirksam beschrieben. Für Picolinsäure (II 15) können wir dies bestätigen, nachdem wir ein über das Cu-Salz gereinigtes Präparat verwandt haben. Die sehr schwache Wirksamkeit des von uns geprüften Picolinsäuremethylesters (I 9) sowie von α -Picolin (II 16) dürfte auf Verunreinigungen beruhen.

Nicotin war in den Versuchen von Knight und McIlwain⁵⁾ bei *Staphylococcus aureus* bis zu 10^{-5} mol völlig wirkungslos. Da das von uns benutzte Präparat (Merck puriss.) bei dieser Konzentration bereits Wirksamkeit zeigte (I 13), wurde es auf verschiedene Weise weiter gereinigt. Nach intensiver Extraktion mit Äther in schwach saurer Lösung war die Aktivität der wäßrigen Schicht auf etwa $\frac{1}{4}$ gesunken. Weitere Operationen, wie Überführen des Nicotins bei alkalischer Reaktion in Äther, Destillation unter Stickstoff bei vermindertem Druck, änderten die Werte nicht mehr (II 17). Es bleibt allerdings immer noch zweifelhaft, ob die Bakterien wirklich Nicotin verwerten können. Bei der großen Empfindlichkeit des Nicotins gegen Licht und Sauerstoff²⁰⁾ dürfte eine völlige Befreiung von Nicotinsäure oder vielleicht ebenfalls aktiven Oxydationszwischenprodukten recht schwierig sein. Außerdem ist zu bedenken, daß selbst ein absolut reines Nicotinpräparat unter den Bedingungen der Bakterienteste (Anwesenheit von Fe^{++} und O_2 , Bildung von H_2O_2 während des Wachstums) nicht unverändert bleiben kann.

Pyridin- β -sulfonsäure ist bereits von Lwoff und Querido⁹⁾ an *Pr. v.* (X 19, *Syrie*) und von Dorfman, Koser u. Saunders⁷⁾ an *Bacterium dysenteriae* geprüft worden. Während von den ersten Autoren minimales Wachstum bei 1×10^{-5} mol gefunden wurde, war die Verbindung bei Ruhr-

¹⁹⁾ Compt. rend. Acad. Sciences 203, 520 [1936].

²⁰⁾ Vergl. z. B. C. H. Rayburn, W. R. Harlan u. H. R. Hammer, Journ. Amer. chem. Soc. 63, 115 [1941].

bazillen bis 1×10^{-4} mol völlig inaktiv. Es ist von größtem Interesse, wenn Sulfonsäuren, die heute als die Antagonisten²¹⁾ der entsprechenden Wuchsstoffcarbonsäuren bekannt sind, nicht nur hemmend wirken, sondern in kleineren Konzentrationen auch diese Wuchsstoffe teilweise zu ersetzen vermögen. Eine sehr schwache Wuchsstoffwirkung ist bereits für Sulfanilsäure beschrieben worden²²⁾. Dagegen wirkt Sulfopantothensäure auf *Sbm. pl.* nur hemmend²³⁾. Auch wir stellten bei *Pr. v.* und weiterhin bei *Sbm. pl.* fest daß Pyridin- β -sulfonsäure (I 6, II 10), Pyridin- β -sulfonsäureamid (I 7, II 11, 12), dessen Jodmethylat (II 13) und Diäthylverbindung (S-Coramin) (I 8, II 14) die Nicotinsäure ersetzen können. Es ist auffallend, daß wir zur Erreichung des Optimums mit Pyridin- β -sulfonsäure je nach dem p_{H} 1000 bis 10000-mal mehr benötigen als Lwoff u. Querido⁹⁾. Pyridin- β -sulfonsäureamid kann aktiver sein; doch erhält man schwankende Werte, besonders bei *Sbm. pl.*, bei dem auch schon die freie Pyridin- β -sulfonsäure ungleichmäßige Ergebnisse liefert. Das ist nicht verwunderlich, da das Pyridin- β -sulfonsäureamid, in dem Konzentrationsgebiet, in dem es die Nicotinsäure zu ersetzen vermag, bereits hemmend²¹⁾ auf *Sbm. pl.* wirkt. Pyridin- β -sulfonamid-jodmethylat ist aktiver als Pyridin- β -sulfonsäureamid, während für die entsprechenden Carbonsäureamide das Umgekehrte gilt. Das von Hrn. Dr. G. Wendt erstmals dargestellte Thionicotinsäureamid (II 18) zeigt bereits in ~ 20 -fach höherer Konzentration den optimalen Wachstumseffekt der Nicotinsäure; sterilisiert man es jedoch nicht mit der Grundlösung, so ist seine Aktivität geringer (II 19). Es ist zu berücksichtigen, daß Thioamide, besonders in Gegenwart von Eisen, leicht entschweifelt werden können. Thiopicolinsäure (II 20, 21) dürfte inaktiv sein.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Dorfman, Koser und Saunders⁷⁾ an *Bacterium dysenteriae* finden wir auch bei *Pr. v.*, daß Pyrazin-carbonsäure-(3) (I 14) und Pyrazin-dicarbonsäure-(2.3) (I 15) unwirksam sind, selbst in Konzentrationen von $m/100$, während die isostere Thiazol-carbonsäure-(5) (I 16, II 22) bei beiden Bakterienstämmen schwach aktiv ist. Meist wird mit dieser Verbindung bei 10000-fach höherer Konzentration, als sie für Nicotinsäure erforderlich ist, nur ein Maximum erreicht, das tiefer liegt als das der Nicotinsäure. Nach F. C. Schmelkes²⁴⁾ ist die Thiazol-carbonsäure-(5) bei *Bacterium dysenteriae* nur 100-mal inaktiver als Nicotinsäure, ein Befund, der von Dorfman u. Mitarbeitern¹⁷⁾ bereits bezweifelt worden ist.

Unsere Untersuchungen erhärten die Ansichten über die strenge Konstitutionsspezifität der Nicotinsäure. Jedoch ist es heute noch nicht möglich, sich über die Art, Bedeutung und Stellung der Substituenten ein so genaues Bild zu machen, wie es für die Komponenten des Aneurins bekannt ist²⁵⁾.

Ausführung der Bakterienversuche.

Zu den Studien an *Pr. v.* wurde zuerst das Nährmedium I (s. Tafel III) verwandt, das aus dem Medium von Lwoff und Querido⁹⁾ entwickelt wurde. Wir prüften 20 Stämme des Hygienischen Instituts der Universität

²¹⁾ Vergl. die nachfolgende Arbeit.

²²⁾ R. Kuhn, E. F. Möller, G. Wendt u. H. Beinert, B. **75**, 711 [1942].

²³⁾ R. Kuhn, Th. Wieland u. E. F. Möller, B. **74**, 1605 [1941].

²⁴⁾ Science [New York] **90**, 113 [1939].

²⁵⁾ W. H. Schopfer, Erg. Biol. **16**, 1 [1939].

Tafel III.
Nährmedien für *Proteus vulgaris*.

Substanz	Nährmedium I (g/ccm)	Nährmedium II (g/ccm)
Ferricitrat (Merck Erg. B 5)	4.2×10^{-5}	0.84×10^{-5}
MnCl ₂ + 4H ₂ O (Merck 5926)	1.25×10^{-5}	0.25×10^{-5}
MgSO ₄ + 7H ₂ O (Merck 5882)	4.2×10^{-4}	0.84×10^{-4}
(NH ₄) ₂ SO ₄ (p. a. Merck 1217)	0.75×10^{-3}	0.75×10^{-3}
KH ₂ PO ₄ (n. Sörensen, Merck 4873)	0.45×10^{-2}	0.45×10^{-2}
KCl (p. a. Merck 24 936)	0.5×10^{-3}	0.5×10^{-3}
KNO ₃ (Merck 5061)	—	2.0×10^{-3}
Glucose (p. a. Merck 8341) ^{a)}	2.0×10^{-2}	2.0×10^{-2}
<i>l</i> -Cysteinhydrochlorid (Hofmann-La Roche)	4.2×10^{-5}	4.2×10^{-5}
<i>d, l</i> -Methionin (synth. Hoffmann-La Roche) ^{b)} ..	0.50×10^{-4}	0.50×10^{-4}
Glykokoll (synth. Stocker) ^{b)}	0.50×10^{-3}	0.50×10^{-3}
<i>d, l</i> -Alanin (synth. Stocker) ^{b)}	0.50×10^{-3}	0.50×10^{-3}
<i>d, l</i> -Valin (synth. Stocker) ^{b)}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-4}
<i>d, l</i> -Leucin (synth. Stocker) ^{b)}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-4}
<i>d, l</i> -Isoleucin (synth. Stocker) ^{b)}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-4}
<i>l</i> -Argininnitrat (Hoffmann-La Roche) ^{b)}	0.50×10^{-4}	0.50×10^{-4}
<i>d, l</i> -Phenylalanin (synth. Stocker) ^{b)}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-4}
<i>l</i> -Tryptophan (Hoffmann-La Roche) ^{b)}	0.50×10^{-4}	0.50×10^{-4}
<i>d, l</i> -Asparaginsäure (synth. Stocker) ^{b)}	0.50×10^{-3}	0.50×10^{-3}
<i>l</i> -Glutaminsäure (Merck) ^{b)}	0.50×10^{-3}	0.50×10^{-3}
Barium (+)-pantothenat (synth. Th. Wieland) ...	1.0×10^{-7}	—
<i>p</i> -Amino-benzoesäure (Heyl & Co.) ^{c)}	1.7×10^{-9}	—
NaOH (p. a. Merck 6498)	zur Einstellg. auf gewünscht. pH	

a) Nach Aufkochen mit 1% Carbo activatus siccus (Merck) in wäbr. hochkonz. Lösung, durch Zugabe von mit Petroläther vergälltem Alkohol bis zu einem Gehalt von 70 Vol.-%, bei -20° umkristallisiert und erst über H₂SO₄, dann über P₂O₅ bei Zimmertemperatur, schließlich über P₂O₅ bei 100° im Vak. getrocknet.

b) Nach Aufkochen mit 1% Carbo activatus siccus (Merck) aus wäbr. Lösung umkristallisiert und im Vak. über P₂O₅ bei Zimmertemperatur getrocknet.

c) 2-mal bei 0.1—1 mm sublimiert.

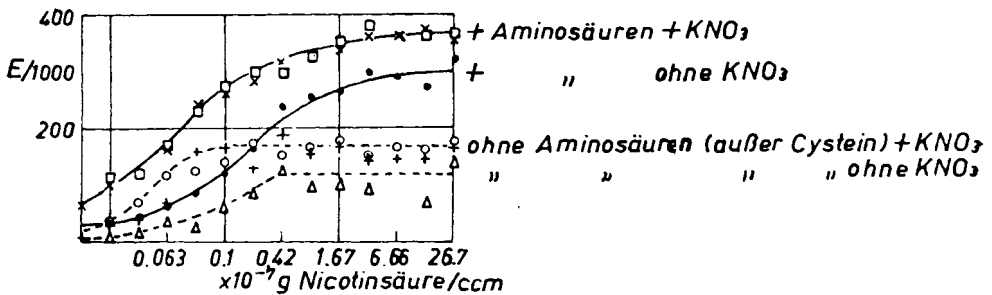
Heidelberg²⁶⁾ und fanden, daß 17 von diesen Stämmen Nicotinsäure zu ihrem Wachstum benötigen und sich auch sonst — soweit untersucht — praktisch gleich verhielten. Ein Stamm wuchs in dem angegebenen Medium auch in Anwesenheit von Nicotinsäure + Panthothensäure²⁷⁾ nicht. Aminosäuren, Pantothenensäure und *p*-Amino-benzoesäure fehlen im Lwoffschen Nährmedium. Wir fanden, daß die Anwesenheit von Aminosäuren²⁸⁾ das Wachstum nicht nur beschleunigt, sondern auch die endgültige Bakterienmenge um etwa 50% erhöht. Allerdings wird dabei die zum optimalen Wachstum benötigte Nicotin-

²⁶⁾ Wir danken Hrn. Dr. Roelcke für Isolierung und Reinzüchtung der Bakterienstämme.

²⁷⁾ Die Notwendigkeit von Pantothenensäure ist bei anderen Proteus-Arten, z. B. für *Prot. Morganii* von M. J. Pelczar jun. u. J. R. Porter, Proceed. Soc. exp. Biol. Med. **43**, 151 [1940] beschrieben worden.

²⁸⁾ Bisher wurde nicht im einzelnen geprüft, ob alle zugegebenen Aminosäuren — es sind diese die für *Sbm. pl.* (10 S, O. J.) erforderlichen — wirklich notwendig sind.

säuremenge wesentlich größer (siehe Abbild. 1). Der Zusatz der beiden zuletzt genannten Wuchsstoffe ist weniger wichtig.



Abbild. 1. Abhängigkeit des Wachstums von *Proteus vulgaris* (3056) von der Nicotinsäure-Konzentration in An- und Abwesenheit von Nitrat und Aminosäuren.

(Beimpfung aus Bouillonkultur, Messung nach 25-stdg. Bebrütung bei 27°).

Die Stämme wurden laufend in Glucose-Mn-Bouillon gezüchtet und jeden zweiten Tag überimpft. Die Beimpfung der Versuchsröhrchen erfolgte direkt aus einer „24-Stdn.-Kultur“ in der genannten Bouillon, und zwar mit einer Pt-Öse (Drahtstärke 0.5 mm, innerer \varnothing 1.0 mm). Die laufenden Kulturen und die Versuchsröhrchen wurden bei 27° gehalten, die Bakterienmengen durch Trübungsmessung im Langeschen Photometer nach 1 (bzw. 1 $\frac{1}{2}$) und 2 Tagen bestimmt. Die Versuche mit dem Nährmedium I befinden sich in der Tafel I.

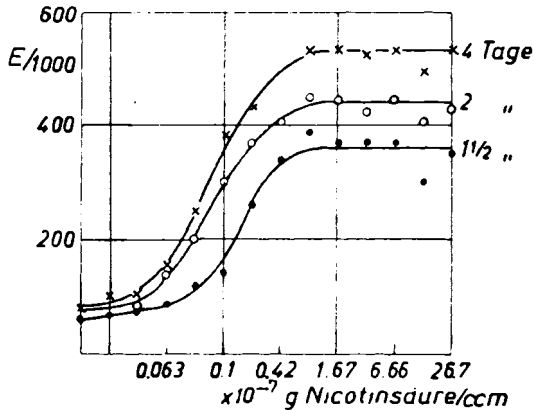
In dem Nährmedium I war das Wachstum unter Verwendung von 6 ccm in normalen Reagensgläsern ($\sim 14 \times \sim 160$ mm) nicht besonders stark und nicht immer gleichmäßig. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß die Bakterien unter den vorliegenden Bedingungen nicht genügend mit Sauerstoff versorgt werden⁹⁾. Inzwischen hat M. Morel²⁰⁾ gefunden, daß anaerobes Wachstum durch Zusatz von SH-Verbindungen und KNO₃ auch bei kleiner Beimpfung möglich ist. Zwar soll KNO₃ nur bei anderen Substraten als Glucose, z. B. bei Milchsäure, notwendig sein. Wir fanden jedoch bei Zusatz von 0.1% KNO₃ zum Nährmedium I, also in Anwesenheit von Glucose und bei schlechter Sauerstoff-Versorgung, eine Steigerung des Wachstums bis zu 50%. Auf diese Weise wird zwar noch nicht das optimale Wachstum, wie es in den besten natürlichen Nährmedien möglich ist, erreicht, aber der Test ist hierdurch wesentlich verbessert, da die Streuungen kleiner sind (s. Abbild. 1). Nach Lwoff und Querido⁹⁾ ist ein Ausgangs-p_H von 7.5 am günstigsten, was wir bestätigen können. Unterhalb p_H 7.5 wird die gebildete Bakterienmenge kleiner, oberhalb p_H 7.5 beobachtet man noch eine geringe Erhöhung, die Nährlösung wird aber mit steigendem p_H rasch durch die bei der Sterilisation eintretende Zersetzung dunkler. Außerdem wird bei höheren p_H-Werten ein schwaches Wachstum bereits ohne Nicotinsäure möglich. In Anwesenheit von KNO₃ ist eine Wirkung von Pantothensäure und *p*-Aminobenzoessäure nicht mehr zu beobachten; schließlich war es günstiger, die Kon-

²⁰⁾ Ann. Inst. Pasteur 67, 449 [1941].

zentration einiger Salze zu verkleinern. Für die weiteren Versuchsserien (s. Tafel II), die wir bei verschiedenem p_H durchführten, wurde die Nährlösung II (s. Tafel III) angewandt.

Bei den Testen mit *Sbm. pl.* entsprachen die Versuchsbedingungen denjenigen, die Möller und Schwarz¹³⁾ für den Test auf *p*-Amino-benzoessäure bereits beschrieben haben, jedoch mit dem Unterschied, daß an Stelle von Nicotinsäure *p*-Amino-benzoessäure in einer Konzentration von 2×10^{-8} g/ccm gegeben wurde. Ferner waren die Aminosäuren etwas niedriger dosiert, und zwar wie bei den *Proteus*-Nährlösungen in Tafel III angegeben; auch Arginin war jetzt zugegen. Die Wirkung von Nicotinsäure auf das Wachstum ist aus Abbild. 3 zu ersehen. Die Ergebnisse mit *Sbm. pl.* finden sich in Tafel II.

Die meisten Autoren geben die optimal wirksamen Konzentrationen an, während Lwoff und Querido⁹⁾ diejenige Konzentration benutzen, bei der „gerade sichtbares Wachstum“ auftritt. Aus dem Verlauf der Kurven (s. Abbild. 1 u. 2), die das Wachstum in Abhängigkeit des zu prüfenden Wuchs-



Abbild. 2. Abhängigkeit des Wachstums von *Streptobacterium plantarum* (10S, O. J.) von den Nicotinsäure-Konzentrationen nach verschiedenen Zeiten. (27°, Beimpfung aus Zwischenkultur).

stoffes darstellen, ist zu ersehen, daß weder beim Optimum noch beim Minimum³⁰⁾ eine genaue Feststellung der Konzentration möglich ist. Im Gebiet des praktisch linearen Verlaufs der Kurven lassen sich aber recht genaue Angaben machen. Wir ziehen es deshalb vor, als Definition der Wirksamkeit eines Wuchsstoffes diejenige Konzentration heranzuziehen, bei der gerade die Hälfte des maximalen Zuwachseffektes erreicht wird. Dies ist bereits in der Arbeit von Kuhn, Möller, Wendt und Beinert²²⁾ geschehen. Nach den Ausführungen von Kuhn, Wieland und Möller²³⁾ ist den Werten bei halboptimalem Wachstum außerdem eine physikalisch-chemische Bedeutung zuzuschreiben.

Als wir vor einem Jahr mit den Versuchen an *Proteus* begannen, waren Nicotinsäure-Teste mit dem Standardstamm 10S O. J. von *Sbm. pl.* nicht mög-

³⁰⁾ Nach unseren Erfahrungen sind die Minimal-Werte noch schlechter definiert als die Optimal-Werte, da die Streuungen bei so schwachem Wachstum ziemlich groß sein können.

lich, da dieser Stamm damals auch ohne Nicotinsäure normales Wachstum zeigte. Es war bereits früher gefunden worden³¹⁾, daß das Nicotinsäurebedürfnis von *Sbm. pl.* starke Unterschiede aufweist. Auf Grund einzelner Meßreihen bestand der Verdacht, daß die Versuchstemperatur für die Ergebnisse von besonderer Bedeutung sein könnte. Dies ließ sich aber nicht bestätigen. Auch hinsichtlich des Bedürfnisses an *p*-Amino-benzoesäure, Adenin und Adermin können sich solche unliebsamen Veränderungen der Stämme einstellen. Ganz ähnliche Erscheinungen hat Kögl³²⁾ für die Bedürftigkeit verschiedener Heferassen an Faktor Z mitgeteilt. Trotz ausgedehnter Versuche ist es bisher nicht möglich gewesen, die Gründe dafür zu finden, warum Mikroorganismen plötzlich ohne einen bis dahin benötigten Wirkstoff auskommen können. Auch zahlreiche Bemühungen, durch variierte Züchtung der veränderten Stämme wieder zu den Ausgangsstämmen zurückzugelangen, schlugen fehl. Das einzige, was wir feststellen konnten, war das gelegentliche spontane Zurückschlagen eines Stammes. Kögl³²⁾ konnte selbst dies nicht beobachten.

Bei der heutigen Lage der Dinge ist es also als ein Glücksfall zu bezeichnen, daß vor einigen Monaten der Standardstamm von *Sbm. pl.* wieder Nicotinsäure zum Wachstum benötigte und es uns so möglich machte, die vorliegende Untersuchung zu Ende zu führen.

Herkunft, Darstellung und Reinigung der Präparate.

Nicotinsäure (E. Merck, purum) 2-mal bei 1 mm sublimiert und anschließend aus Wasser mit 1% Tierkohle (Carbo activatus siccus, Merck) umkrystallisiert.

Nicotinsäureamid (E. Merck) 1-mal aus Wasser umkrystallisiert. — Nicotinsäureamid-jodmethylat nach Karrer und Mitarbeitern³³⁾. — Coramin (Ciba, in Ampullen, 25 gew.-proz. Lösung). Cozymase, dargestellt nach P. Ohlmeyer³⁴⁾.

Pyridin- β -sulfonsäure: In Anlehnung an die Methode von G. Machek³⁵⁾ gelang es uns durch Arbeiten im Bombenrohr und Erhöhung der Versuchstemperatur, die Ausbeute an Pyridin- β -sulfonsäure von 40% auf 75% zu steigern. 32.5 g rauchende Schwefelsäure (20% SO₃) und 0.175 g Quecksilbersulfat werden im Bombenrohr vorsichtig mit 5 g über Bariumoxyd dest. Pyridin vermischt und etwa 15 Stdn. auf 260—265° erhitzt. Der fast farblose Bombeninhalte wird in etwa 100—150 ccm Wasser eingetragen, mit festem Bariumcarbonat in der Hitze neutralisiert, zentrifugiert und 4-mal heiß gewaschen. Lösung und Waschwasser werden zur Trockne eingedampft, das zurückgebliebene Bariumsalz der Sulfonsäure gewogen und mit der der Formel C₆H₄N.SO₃Ba_{1/2} + 2H₂O entsprechenden Menge Schwefelsäure versetzt. Hierauf wird erneut vom Bariumniederschlag abzentrifugiert und 4-mal gewaschen. Lösung sowie Waschwasser werden zur Trockne einge-

³¹⁾ E. F. Möller, Ztschr. physiol. Chem. **260**, 246 [1933].

³²⁾ F. Kögl u. W. A. J. Borg, Ztschr. physiol. Chem. **269**, 97 [1941].

³³⁾ P. Karrer, G. Schwarzenbach, F. Benz u. U. Solimssen, Helv. chim. Acta **19**, 826 [1936].

³⁴⁾ Biochem. Ztschr. **297**, 66 [1938].

³⁵⁾ Monatsh. Chem. **72**, 77 [1938].

dampft. Die zurückgebliebene Pyridin- β -sulfonsäure wird aus 80-proz. Alkohol umkrystallisiert.

3.075 mg Subst.: 0.235 ccm N_2 (24°, 747 mm).

$C_5H_5O_3NS$. Ber. N 8.80. Gef. N 8.63.

Pyridin- β -sulfonamid³⁶⁾, Pyridin- β -sulfonsäure-diäthylamid (S-Coramin)³⁶⁾, Pyridin- β -sulfonsäureamid-jodmethylat³⁶⁾.

Picolinsäure (Heyl & Co.) über das Cu-Salz gereinigt und aus Essigester umkrystallisiert. Schmp. 127—129°. — α -Picolin (Riedel-de Haën).

Nicotin (E. Merck, puriss.) wurde in wäßriger Lösung bei pH 6.6 16 Stdn. im Apparat mit Äther extrahiert, um u. U. vorhandene Nicotinsäure zu entfernen. Die wäßr. Nicotin-Lösung wurde dann bei alkalischer Reaktion (Zugabe von NaOH) mit Äther ausgeschüttelt, und der Ätherrückstand im Vak. (1 mm) unter reinstem Stickstoff destilliert.

Pyrazin-dicarbonensäure-(2,3) und Pyrazin-monocarbonensäure-(3) nach S. Gabriel und A. Sonn³⁶⁾. — Thio-nicotinsäureamid und Thio-picolinsäureamid waren von Hrn. Dr. G. Wendt überlassene Präparate, über deren Darstellung noch berichtet werden wird. — Thiazol-carbonsäure-(5) nach H. Erlenmeyer und H. von Meyenburg^{37,38)}. — Chinaldinsäure (E. Merck, p.a.). — Chinolin- β -carbonensäure (I. G.) aus Eisessig umkrystallisiert, Schmp. 278—279°.

Frau A. Birkofer, Frä. A. Roehse u. Hrn. K. Breitwieser danken wir für technische Mitarbeit.

156. Ernst Friedrich Möller und Leonhard Birkofer: Gibt es Antagonisten der Nicotinsäure bei *Proteus vulgaris* und *Streptobacterium plantarum*?

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 3. August 1942.)

Es ist schon lange bekannt, daß die wirksamen Dosen bakteriostatischer Stoffe vom Nährmedium, in dem die Organismen gezüchtet werden, abhängig sind. Aber erst in den letzten Jahren hat man sich damit beschäftigt, die für diese Unterschiede verantwortlichen Stoffe auch chemisch näher kennenzulernen. So konnte P. Fildes¹⁾ zeigen, daß die Hemmung von Quecksilber II-chlorid auf *Bacterium coli* von —SH-Verbindungen aufgehoben wird. Von besonderem Interesse war, daß D. D. Woods und P. Fildes²⁾ einen Antagonisten zu der therapeutisch so wichtigen Gruppe der Sulfonamide in der *p*-Amino-benzoesäure fanden. Die Tatsache, daß der Ersatz z. B. der Carboxyl-

³⁶⁾ B. 40, 4851 [1907].

³⁷⁾ H. Erlenmeyer u. H. von Meyenburg, Helv. chim. Acta 20, 205 [1937].

³⁸⁾ Wir danken Hrn. Dr. O. Dann für Überlassung eines von ihm dargestellten Präparats.

¹⁾ Brit. Journ. exp. Pathol. 21, 67 [1940].

²⁾ Chem. Industries 59, 133 [1940]; D. D. Woods, Brit. Journ. exp. Pathol. 21, 74 [1940].