©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Der Einfluß einer Anzahl Aminosäuren auf die Biosynthese von Vitamin B_{12} durch Streptomyces-griseus $N_Z C_5$

Von Wolfgang G. Kurz.

Königliche Technische Hochschule, Institut für Lebensmittelchemie, Stockholm, Schweden.

Inhaltsverzeichnis.

Historischer Überblick 390
Vitamin B_{12}-Faktoren 391
Mikrobiologische Aktivität der Faktoren 394
Vorkommen von Vitamin B_{12} 396
Nachweis und Bestimmung 396
Beschreibung der Testorganismen für Vitamin B_{12}
Lactobacillus leichmannii 313 399
Escherichia coli 113—3 400
Aufgabe und Ziel der Abhandlung 401

Analysemethoden.

I. Bestimmung von Vitamin B_{12} 401
a) Lochtestmethode 401
b) Röhrchenmethode 402
c) Papierchromatographische Bestimmung verschiedener Vitamin B_{12}-Faktoren 403

II. Andere Bestimmungen
a) pH-Wertbestimmung 404
b) Zuckerbestimmung 404
c) Myzeltrockengewichtsbestimmung 404
d) Totalstickstoffbestimmung 404

Experimentelle Durchführung der Versuche.
Organismus (*Streptomyces griseus* N_zC_5) 404
Zusammensetzung des stickstoffreien Grundmediums 405

A. Gärungen am Schütteltisch 405
B. Gärungen in stationären Gefässen 406
Gärapparatur 406
Sterilisierung und Dosierung der Luft 407
Sterilisierung von Gärgefäss und Substrat 407
Impfung 407
Dämpfung der Schaumbildung 408
Probenentnahme 408

Anordnung und Ergebnisse der Versuche. 408
Diskussion 411
Zusammenfassung 414
Literaturverzeichnis 415
Versuchsdiagramme 418
Plan der Gärgefässe 421

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Historischer Überblick.

Im Jahre 1926 entdeckten Minot und Murphy[1]), dass bei perniziöser Anämie, einer bisher unheilbaren Krankheit, durch Behandlung mit roher Leber eine Besserung erzielt werden konnte. Diese Entdeckung veranlasste zahlreiche Forschergruppen sich mit der Isolierung dieses antiperniziösen Anämiefaktors (APA-Faktor) zu befassen, doch stiess man bald Mangels genauer Testmethoden auf unüberwindliche Schwierigkeiten.

Als M. Shorb[2])[3]) 1947 entdeckte, dass der APA-Faktor für *Lactobacillus lactis* Dorner ein Zuwachsfaktor ist, war ein geeigneter Testorganismus gefunden und damit der Weg für eine intensive Forschung geebnet. Schon im Jahre 1948, also mehr als 20 Jahre nach der Entdeckung Minot's und Murphy's, konnte der APA-Faktor fast gleichzeitig von Folkers und Mitarbeiter[4]) in den Merck-laboratorien in U.S.A. und von Lester Smith und Mitarbeiter[5])[6]) in den Glaxo Laboratorien in England in kristallisierter Form isoliert werden. Man gab dem APA-Faktor den Namen Vitamin B_{12}.

Vitamin B_{12} hat die empirische Formel $C_{63} H_{90} N_{14} O_{14} P Co$ und ist die einzige bisher bekannte organische Kobaltverbindung. Das Kobalt im Vitamin B_{12} befindet sich im 3-wertigen Zustand. Die Verbindung kristallisiert in intensiv roten Kristallen, die bei einer Temperatur von 210° C zerfallen. Vitamin B_{12} ist linksdrehend und dessen Absorptionsspektrum in wässriger Lösung zeigt unter anderem ein sehr charakteristisches scharfes Maximum bei 3610 Å und ein breiteres bei 5480 Å. Vitamin B_{12} ist löslich in Wasser und Alkoholen, jedoch unlöslich in Aceton, Äther oder Chloroform, Autoklavieren während 15 Minuten bei 1 atü und einem pH-Wert zwischen 3 und 9 in Anwesenheit von Cyanid oder Bisulfitionen hat keinen Einfluss auf die Aktivität. Autoklavieren bei pH 1 oder 13 unter denselben Bedingungen inaktiviert das Vitamin vollständig.

Die Strukturaufklärung wurde durch Verwendung der Röntgenspektrographie[7])[8])[9]) ermöglicht. Vitamin B_{12} besteht aus 4 reduzierten mit Propionsäure- und Essigsäureresten substituierten Pyrrolringen welche an ein zentrales Kobaltatom gebunden sind. Auf diesen Teil des Atoms, der in einer Ebene liegt, folgt ein Benzimidazol-Ribosid das einerseits an das zentrale Kobaltatom, andererseits an einen Phosphorsäurerest gebunden ist. Dieser Phosphorsäurerest, der über ein Aminopropanol an Pyrrolring D gebunden ist, schliesst den äusseren Ring des Vitamin B_{12}. Die Cyanidgruppe ist in entgegengesetzter Richtung zum Benzimidazolring ebenfalls direkt an das Kobaltatom gebunden.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Vitamin B_{12}-Faktoren.

Ausser Cyanocobalamin sind verschiedene, zum Teil chemisch sehr nah verwandte Verbindungen bekannt, von welchen einige antianämische Wirkung besitzen.

Durch katalytische Reduktion von Vitamin B_{12} in Anwesenheit von Sauerstoff erhielt Kazcka und Mitarbeiter[10]) eine Verbindung, die sie Vitamin B_{12a} nannten. Eine Verbindung, genannt Vitamin B_{12b}, wurde aus Fermentationslösungen von *Streptomyces aurofaciens* isoliert. Wie sich später herausstellte, sind diese beiden Verbindungen identisch und enthalten an Stelle der Cyanogruppe in ihrem Molekül eine Hydroxogruppe. Diese Verbindung bekam den Namen Hydroxocobalamin. Hydroxocobalamin kann durch Zusatz von CN-Ionen in Cyanocobalamin und dieses wiederum durch Lichteinfluss in saurer Lösung in Hydroxocobalamin übergeführt werden. Die Kenntnis dieser Reaktion war für die vorliegende Arbeit besonders wichtig, da bei den angewandten Testmethoden eine zu grosse Menge von Hydroxocobalamin Fehlresultate bei der Bestimmung der Gesamtaktivität gibt.

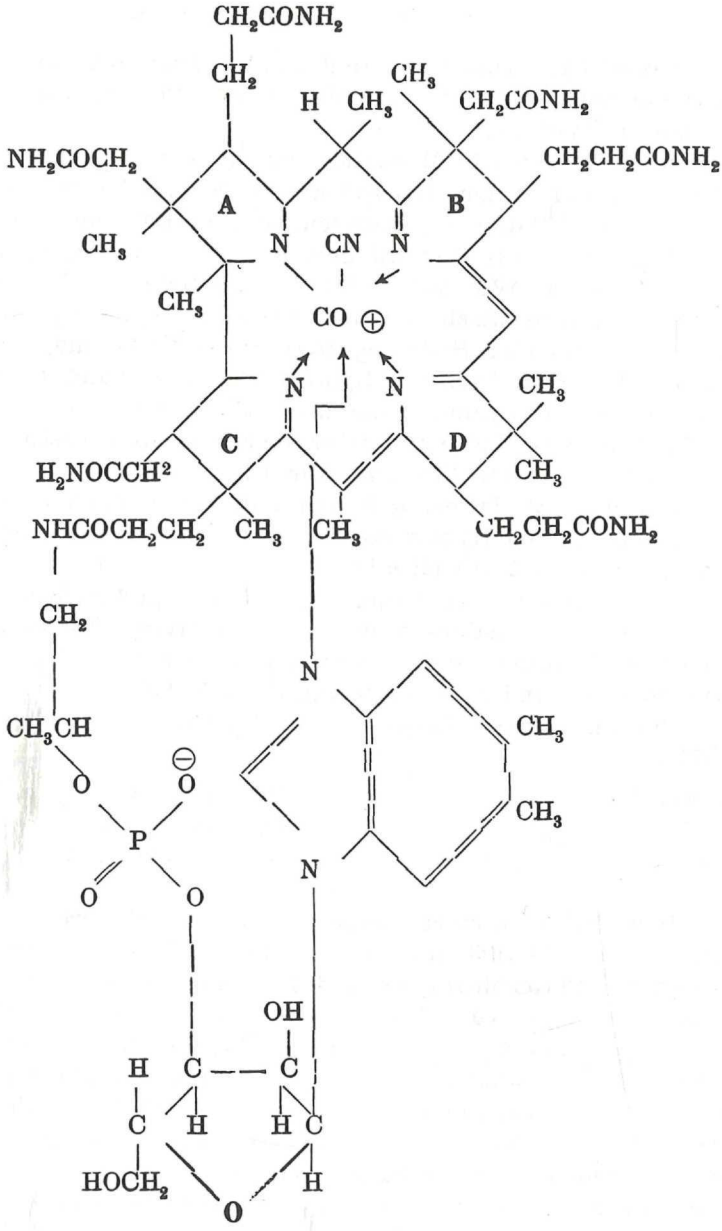
Ausser diesen zwei Vitamin B_{12}-Faktoren gibt es noch zahlreiche andere, deren Konstitution zum Teil geklärt ist. Sie unterscheiden sich vom Cyanocobalamin dadurch, dass an Stelle des 5,6-Dimethylbenzimidazols andere Basen treten. Siehe Tabelle 1, 2 und 3.

Die bei Fermentationen am häufigsten auftretenden Faktoren sind:

Faktor B	Pseudovitamin B_{12}
Faktor A (B_{12m})	Cyanocobalamin
Faktor C_1 und C_2	Hydroxocobalamin (B_{12a})

Diese Faktoren unterscheiden sich auch noch durch verschiedene biologische Aktivität und verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten bei Chromatographie und Elektrophporese. Ford und Mitarbeiter[11]) und Bernhauer und Mitarbeiter[53]) synthetisierten neue B_{12}-Faktoren, indem sie einer *Escherichia coli*-Kultur, die in einem Medium wuchs, das Faktor B enthielt, verschiedene Derivate von Purin und Benzimidazol zusetzten. Dadurch konnte durch Zusatz der entsprechenden Base zu Faktor B Cyanocobalamin, Pseudovitamin B_{12} und Faktor A erhalten werden. Die Biosynthese von neuen Vitamin B_{12}-ähnlichen Faktoren ist nicht nur von theoretischem Interesse, sondern hat auch in der Praxis Bedeutung. Es lassen sich dadurch nicht nur Faktoren mit grösserer biologischer Wirkung, sondern auch solche mit Antivitaminwirkung[45]) herstellen. Wie die vorliegenden Tabellen zeigen, konnte bereits die Existenz einer grossen Anzahl von Vitamin B_{12}-Faktoren nachgewiesen werden. Am Institut für Lebensmittelchemie an der Königlichen Technischen

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



Vitamin B_{12}

$C_{63}H_{90}N_{14}O_{14}PCo$

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Vitamin B_{12}-Faktoren. Tabelle 1.

Verbindung	Ähnlichkeit o. Identität	Nukleotid	Biol. Aktivität gegen pernic. Anämie
Pseudovitamin B_{12} (Dion et al. 1952) [33]. (cyano-β-cobalamin)		Adenin	0
Pseudovitamin B_{12b} (Pfiffner et al. 1952) [34] (cyano-γ-cobalamin)	ψ-Vitamin B_{12}	Adenin	0
Pseudovitamin B_{12b} (Dion et al. 1954) [35]	Faktor A	2-Methyladenin	0
Pseudovitamin B_{12f} (Pfiffner et al. 1954 [36]	ψ-Vitamin B_{12d}	2-Methyladenin	0
Vitamin B_{12f} (Lewis et al. 1952) [37, 38]	ψ-Vitamin B_{12} + Faktor A		0
Vitamin B_{12m} (Wijmenga 1951) [39]	Faktor A	2-Methyladenin	0
Vitamin B_{12s} (Ericson 1953) [40]	Faktor C_2 ?	?	?
Faktor A (Ford und Porter 1953) [41] (cyano-ω-cobalamin)	ψ-Vitamin B_{12d}	2-Methyladenin	0
Faktor B (Ford und Porter 1953) [41]	Vitamin B_{12}-Nukleotid	keines	0
Faktor C_1 und C_2 (Ford, Porter, Ericson 1953) [41, 40]	?	?	?
Faktor G (Brown und Smith 1954) [42]	Deaminiertes ψB_{12}	Hypoxanthin	?
Faktor H (Brown und Smith 1954) [42]	Deaminierter Faktor A	2-Methylhypoxanthin	?
Faktor WR (Wijmenga 1951) [39]	Faktor A + ψ-Vitamin B_{12}		0
Faktor III (Friedrich und Bernhauer 1953) [43]	?	?	+

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Mikrobiologische Aktivität. Tabelle 2.

Verbindung	*Escherichia coli* 113—3 Plattentest	*Escherichia coli* 113—3 Röhrchentest	*Lactobacillus leichmannii* Röhrchentest	*Euglena gracilis* Röhrchentest	*Ochromonas malhamensis* Röhrchentest
Pseudovitamin B_{12} (Dion et al. 1952) [33] (cyano-β-cobalamin)	+++	+	++	+++	0
Pseudovitamin B_{12b} (Pfiffner et al. 1952 [34])	+++	+	++	+++	0
(cyano-γ-cobalamin)	+++	++	++	++	0
Pseudovitamin B_{12d} (Dion et al. 1954 [35])	+++	++	++	++	0
Pseudovitamin B_{12f} (Pfiffner et al. 1954) [36]					
Vitamin B_{12f} (Lewis et al. 1952) [37, 38]	+++	++	++	++	0
Vitamin B_{12m} (Wijmenga 1951) [39]	+++	++	++	++	0
Vitamin B_{12s} (Ericson 1953) [40]	+++	+	++	+	0
Faktor A (Ford und Porter 1953) [41] (cyano-ω-cobalamin)	+++	++	++	++	0
Faktor B (Ford und Porter 1953) [41]	+++	+	0	0	0
Faktor C_1 und C_2 (Ford, Porter, Ericson 1953) [41, 40]	+++	+	++	+	0
Faktor G (Brown und Smith 1954) [42]	+++		++		0
Faktor H (Brown und Smith 1954) [42]	+++	+	++		0
Faktor WR (Wijmenga 1951) [39]	+++	++	++	++	0
Faktor III (Friedrich und Bernhauer 1953) [43]	+++	++	++		++

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Vitamin B_{12}-Faktoren. Tabelle 3.

Verbindung	Ähnlichkeit oder Indentität	Nukleotid	gegen pernic. Anämie Biol. Aktivität
Faktor W (Neujahr 1956) [44]		?	?
Faktor V (Neujahr 1956) [44]	Faktor III?	?	?
Faktor Z_2, Z_3 (Neujahr 1956) [44]	Faktor C?	?	?

Mikrobiologische Aktivität.

Verbindung	*Escherichia coli* 113—3 Plattentest	*Escherichia coli* 113—3 Röhrchentest	*Ochromonas malhamensis* Röhrchentest
Faktor W	+++	+++	++
Faktor V	+++	+++	++
Faktor Z_2, Z_3	+++	++	0

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at
Hochschule in Stockholm fanden Ericson und Lewis (1953)[40]) in Algen eine Reihe neuer Vitamin B_{12}-Faktoren. Auch im Schlamm der Abwasserreinigung wurden neue Faktoren entdeckt. Die Hauptarbeit auf diesem Gebiet wurde von Hoover und Mitarbeitern[54]), Sjöström und Mitarbeitern[55]), Bernhauer und Mitarbeitern[43]) und Neujahr[44]) geleistet.

Parallel mit den Forschungen über die antianämische Wirkung von Leberpräparaten gingen Untersuchungen über einen Faktor, der in tierischen Proteinen enthalten ist und bei dessen Fehlen Stoffwechselstörungen auftreten. Man wusste schon viele Jahre, dass pflanzliches Eiweiss tierischem bei der Verfütterung an gewisse Tiere oft unterlegen war. Dies beruhte nicht auf dem Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung, sondern auf dem Fehlen eines Faktors. Mit Hilfe dieses besonders in der Leber reichlich gespeicherten Faktors kann das Pflanzenprotein ebenso ausgewertet werden wie Tierprotein[12])[13]). Nach der Isolierung des Vitamin B_{12} wurde festgestellt, dass dieses die Mangelerscheinungen, die beim Fehlen des Tierproteinfaktors auftraten, aufhob. Diese Erkenntnis findet heute praktische Anwendung bei der Fütterung von Schweinen und Küken. Die Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit kann 20—30% betragen, wenn bei der Verfütterung von Pflanzenproteinen Vitamin B_{12} zugesetzt wird.

Eine Erklärung für diesen unerwarteten Effekt kann folgender sein: Alle Tiere, inklusive der Mensch, benötigen Vitamin B_{12} und andere Vitamine in gewisser Menge, um die maximale Zuwachsgeschwindigkeit erreichen zu können. Wiederkäuer besitzen in ihrem Pansen eine Mikroflora, die Vitamin B_{12} und ähnliche Substanzen erzeugt, die dann assimiliert werden. Diese Tiere sind daher im Bezug auf Cobalamin autark. Andere Tiere fordern aber mehr oder weniger grosse Mengen des Vitamins im Futter. Es ist ebenso nachgewiesen worden, dass durch die Zugabe von Antibiotika (Penicillin, Aureomycin usw.) ein ähnlicher Zuwachseffekt erreicht wird. Vielleicht stehen diese zwei Erscheinungen miteinander in Verbindung. Zusatz von Antibiotika zum Futter kann bei diesen Tieren die Darmflora in der Weise verändern, dass entweder Vitamin B_{12}-zerstörende Bakterien zurückgedrängt werden oder aber auch Vitamin B_{12}-bildende Bakterien in ihrem Wachstum begünstigt werden. Dass ganz verschiedene Resultate an verschiedenen Orten bei ein und derselben Tierart beobachtet wurden, erklärt sich durch die lokal bedingte Verschiedenheit der Darmflora. Eine andere Erklärung für die mit Antibiotika erhaltene Steigerung der Zuwachsgeschwindigkeit bei Schweinen und Küken wurde von Weber[14]) vorgeschlagen. Nach dieser sollen die antibiotischen Substanzen eine Erhöhung der Wasseraufnahme im Darm und damit auch eine vermehrte Nährstoffassimilation hervorrufen.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Vorkommen von Vitamin B_{12}.

Vitamin B_{12} findet sich in allen tierischen Geweben. Die Verteilung des Vitamins ist in Bezug auf Tierart und Organ sehr verschieden. Eine andere Quelle für Vitamin B_{12} sind gewisse Mikroorganismen, die dieses synthetisieren. So findet sich Vitamin B_{12} in Fermentationslösungen von Streptomyceten, *Bacillus megaterium, Escherichia coli,* u. a. m. Neuerdings wurde gefunden, dass im Schlamm der Abwasserreinigung eine Quelle für Vitamin B_{12} vorliegt. Es scheint, als ob der Ursprung von allen Vitamin B_{12}-Faktoren bei Mikroorganismen zu suchen ist, auch jener, die in tierischen Geweben vorkommen, da diese durch die Nahrung zugeführt werden oder von im Darmkanal lebenden Mikroorganismen stammen. Die grossen Mengen von Vitamin B_{12} in Meeresalgen sind ebenso auf die an ihnen lebenden Mikroorganismen zurückzuführen [40]).

Bestimmung.

Zur Bestimmung von Vitamin B_{12} können sowohl chemische als auch biologische Methoden angewendet werden. Allgemein kann gesagt werden, dass die spektrophotometrischen und chemischen Methoden eine relativ hohe Konzentration und reine Lösungen voraussetzen und daher für den Nachweis von Vitamin B_{12} in biologischem Material meistens nicht in Betracht kommen. Tierteste mit Ratten und Küken sind ziemlich zeitraubend und oft schwer zu beurteilen.

Die grösste Bedeutung haben die mikrobiologischen Methoden, bei denen man Mikroorganismen anwendet, die für ihr Wachstum unter gewissen Bedingungen einen absoluten Bedarf an Vitamin B_{12} haben. Neben dem vorhin genannten *Lactobacillus lactis* Dorner, der wegen seiner Unspezifität seine frühere Bedeutung verloren hat, verwendet man zwei weitere Milchsäurebakterien, eine Mutante von *Escherichia coli,* ferner *Euglena gracilis* var. *bacillaris* und die Chrysomonade *Ochromonas malhamensis.* Diese fordern für ihr Wachstum gewisse Salze, Aminosäuren und Vitamine, eben auch Vitamin B_{12}. Die letztere Eigenschaft wird für die Bestimmung von Vitamin B_{12} ausgenützt. Ähnliche Methoden werden schon seit langem für die Bestimmung verschiedener Aminosäuren und Vitamine angewendet.

Von den oben angeführten Organismen ist der letztgenannte (*Ochromonas malhamensis*) spezifischer für Cobalamin, während bei den anderen Organismen dieses durch andere bekannte Zuwachsfaktoren ersetzt werden kann. *Euglena gracilis* var. *bacillaris* ist der empfindlichste der genannten Organismen und der einzige, der zum Nachweis von Vitamin B_{12}-Spuren angewendet werden kann. Ein Zuwachseffekt wird schon bei 1×10^{-12} g B_{12}/ml erreicht.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Organismen, die Vitamin B_{12} benötigen, kann man gemäss ihrer Fähigkeit, an Stelle für dieses auch Methonin oder Nukleinsäurederivate für ihr Wachstum anwenden zu können, in drei Gruppen einteilen: 1. solche, die an Stelle von Vitamin B_{12} Methionin, 2. solche, die Deoxyriboside und Purine an Stelle von Vitamin B_{12}, 3. solche, welche weder Methionin noch Deoxyriboside und Purine, sondern nur Vitamin B_{12} anwenden können. Man vermutet, dass Vitamin B_{12} in allen drei Gruppen, aber in verschiedener Weise, als Biokatalysator wirkt.

In Leber, Fleisch, Milch, *Streptomyces*-Fermentationslösungen und anderen Naturprodukten liegt Vitamin B_{12} zum grössten Teil in gebundener Form vor. Um ein Bild von der Gesamtmenge zu bekommen, muss das gebundene Vitamin in freie Form übergeführt werden. In vielen Fällen, z. B. wenn es sich um vergorene Lösungen oder Schlamm handelt, setzt man das Vitamin durch einfaches Autoklavieren in wässriger Lösung bei einem bestimmten pH-Wert frei. Bei Analysen von proteinreichem Material hingegen, muss der Grossteil des Vitamins durch Behandlung mit proteinspaltenden Fermenten in Freiheit gesetzt werden. Sowohl bei der Wärme- als auch bei der Fermentbehandlung ist ein Zusatz von Cyanidionen von Vorteil, da dadurch teils Hydroxocobalamin in das beständigere Cyanocobalamin übergeführt wird, teils in grössere Mengen von gebundenem Vitamin B_{12} auf Grund der dem Cyanid-Ion zukommenden grossen Komplexbildungsfähigkeit freigesetzt werden. An Stelle von Cyanid kann auch Bisulfit verwendet werden. Eine umfassende Untersuchung über die Probenbehandlung bei Vitamin B_{12}-Bestimmungen wurde von Krieger[15]) ausgeführt.

Wenn man Vitamin B_{12}-fordernde Lactobacillen als Testorganismen verwenden will, werden diese in einem Nährsubstrat gezüchtet, das alle Zuwachsfaktoren mit Ausnahme von Vitamin B_{12} in optimaler Menge enthält. Vitamin B_{12} wird nur als Spur zugegeben, um eine Anreicherung desselben in den Mikroorganismen zu vermeiden. Die so erhaltene Zellmasse wird einige Male in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, auf die gewünschte Konzentration verdünnt und einer sterilen Nährlösung, welche alle Stoffe ausser Vitamin B_{12} enthält, zugesetzt. Zu einer Proberöhre, gefüllt mit 5 ml der so erhaltenen Zellsuspension, setzt man nun 5 ml sterile Probe. Das Gemisch wird bei optimaler Temperatur inkubiert und nach einer gewissen Zeit der Bakterienzuwachs gemessen, welcher sich proportional zum Vitamin B_{12}-Gehalt der Probelösung verhält. Diesen Vitamin B_{12}-Gehalt errechnet man durch Vergleich mit dem Bakterienzuwachs, in einer Mischung von 5 ml der obigen Bakteriensuspension und 5 ml einer Vitamin B_{12}-Standardlösung. Die Messung kann turbidimetrisch oder titrimetrisch ausgeführt werden. Im letzteren Fall bestimmt man die von den Bakterien gebildete Milchsäure,

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at
welche ein Mass des Zuwachses ist. Bei dieser Methode, genannt „Röhrchentest", stören sämtliche Deoxyriboside und Deoxyribotide, welche alle Vitamin B_{12} als Zuwachsfaktor bei den in Frage kommenden Lactobacillen ersetzen können. Durch Autoklavieren der Proben bei pH 13 wird Vitamin B_{12} zerstört, während die Deoxyriboside und Deoxyribotide beständig sind. Der Deoxyribosid- und Deoxyribotidgehalt wird dann mit den jeweiligen Organismen bestimmt und der Vitamin B_{12}-Gehalt durch Subtraktion berechnet. Diese Methode fordert viel Arbeit, da mindestens 10 Röhrchen für jede Verdünnung von Probe und Standard erforderlich sind. Die Genauigkeit ist nicht höher als ca. ± 20%. Eine grössere Genauigkeit (ca. ± 10%) erhält man, wenn man statt Lactobacillen die Mutante *Escherichia coli* 113—3 anwendet, für die Deoxyriboside und Deoxyribotide keine Zuwachsfaktoren sind. Diese Mutante reagiert ausser auf Vitamin B_{12} noch auf Methionin und gewisse Peptide. Methionin stört aber beim Röhrchentest erst dann, wenn es in einer 10.000mal grösseren Menge als Vitamin B_{12} in der Probe vorhanden ist.

Bei der „Lochtestmethode" werden die gleichen Organismen und Substrate wie bei der oben genannten Röhrchentestmethode angewendet. Das Bestimmungssubstrat wird mit 1,5% Agar versetzt, mit den Testorganismen beimpft und zu dünnen Platten ausgegossen. Aus diesen Platten werden Löcher ausgestochen, in welche 0,03 ml von Probe- bzw. Standardlösungen pipettiert werden. Die Platten werden bei der optimalen Temperatur inkubiert und nach ca. 12 Stunden wird der Durchmesser, der sich rings der Löcher gebildeten Zuwachszonen gemessen. Diese Diameter verhalten sich direkt proportional dem Logarithmus der Vitamin B_{12}-Konzentrationen. Diese werden wie beim Röhrchentest durch Vergleich mit den bei verschiedenen Standardlösungen erfolgten Zuwachs erhalten. Bei der Lochtestmethode stören die Deoxyriboside, Deoxyribotide und Methionin weniger, da man an der Art der Ringausbildung ein gutes Unterscheidungsmerkmal gegenüber Ringen, die durch Vitamin B_{12} gebildet werden, hat.

Zwei der Lochtestmethode sehr verwandte Analysenverfahren sind die Paper-Disc- und die Cup-Methode. Bei der ersteren werden Filterpapierscheibchen mit der zu testenden Probe getränkt und auf die Testplatte gelegt. Bei der Cupmethode werden kleine Stahlzylinder auf die Testplatte aufgesetzt, in die man dann ähnlich wie bei der Lochtestmethode die zu testende Probe einpipettiert.

Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit verwendeten Organismen und Nährmedien genauer beschrieben.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Lactobacillus leichmannii 313.

(R. P. Tittsler) ATCC 7830 [16]).

Dieser Organismus reagiert ausser auf Vitamin B_{12} auch auf Thymidin und andere Deoxyriboside und Deoxyribotide. Er ist sehr empfindlich im Bezug auf Vitamin B_{12} und ist nur dann unbrauchbar, wenn die Testlösung grosse Mengen von nukleärem Material und geringe Mengen Vitamin B_{12} enthält. Die ungefähr 1000fache Menge an Deoxyribosiden ist erforderlich, um den gleichen Effekt, wie er durch Vitamin B_{12} hervorgerufen wird, zu erhalten.

Der verwendete Nährboden hat folgende Zusammensetzung:

1000 ml des Grundmediums enthalten:

Casein (HCl-hydrolisiert) vitaminfrei (Difco)	5,0 g		
DL-α-Alanin	100 mg	Pyridoxal	1 mg
DL-Asparagin	100 mg	Pyridoxamin	1 mg
L-Cystin	100 mg	p-Aminobenzoesäure	0,5 mg
L-Cystein . HCL	100 mg	Biotin	20 γ
DL-Tryptophan	100 mg	Folsäure	20 γ
Adenin	10 mg	Glukose	20 g
Guanin	10 mg	$(NH_4)_2SO_4$	1 g
Xanthin	10 mg	NaCl	1 g
Uracil	10 mg	NaAc . 3 H_2O	20 g
Vitamin B_1	1 mg	K_2HPO_4	1 g
Vitamin B_2	1 mg	$MgSO_4$. 7 H_2O	100 mg
Nicotinsäureamid	1 mg	$MnSO_4$. 4 H_2O	30 mg
Ca-pantothenat	1 mg	$FeSO_4$. 7 H_2O	10 mg
Pyridoxin	1 mg	Tween 80	0,5 ml

pH — 6,5 Agar 3 g/150 ml Grundmedium = 1 Testplatte

Das Bakterium wurde auf „Micro Assay Culture Agar (Difco)" in Stichkultur gezogen.

Bacto-Yeast Extract	20 g
Proteose Peptone No 3 (Difco)	5 g
Bacto-Dextrose	10 g
KH_2PO_4	2 g
Sorbitan Monooleate Complex	0,1 g
Bacto-Agar	10 g
H_2O	1000 ml

Die Stammkultur wurde mindestens jeden dritten Monat umgeimpft, 24 Stunden bei 37° C inkubiert und danach bei + 4° C gelagert.

Die Züchtung der Zellmassen für die Röhrchen- und Agarplattenteste wurden in „Micro Inoculum Broth (Difco)" vorgenommen.

Bacto-Yeast Extract	20 g
Proteose Peptone No 3 (Difco)	5 g
Bacto-Dextrose	10 g
KH_2PO_4	2 g
Sorbitan Monooleate Complex	0,1 g
H_2O	1000 ml

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Escherichia coli 113—3[17]).

Diese Mutante ist ein ausgezeichneter Testorganismus für fast alle natürlich vorkommenden Vitamin B_{12}-Faktoren. Ein Grossteil dieser konnte erst mit Hilfe von *Escherichia coli* 113—3 in Verbindung mit der Bioautographie von Papierchromatogrammen und Elektropherogrammen entdeckt werden. Die Bildung von Vitamin B_{12} ist bei dieser Mutante, durch die Unfähigkeit den Faktor B synthetisieren zu können, gestört. Störend wirken grosse Mengen von Methionin.

Der verwendete Nährboden ist ein rein synthetischer und hat folgende Zusammensetzung:

1000 ml des Grundmediums enthalten:

K_2HPO_4	7 g	$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,1 g
KH_2PO_4	3 g	$(NH_4)_2SO_4$	1 g
Na-citrat . $2 H_2O$	0,5 g	NaCN-Lösung 1%ig	0,1 ml
	pH 7		

Die Mutante wurde auf „Nutrient Agar (Difco)" in Schrägagarkultur gezogen.

Bacto-Beef Extract	3 g
Bacto-Peptone	5 g
Bacto-Agar	15 g
H_2O	1000 ml

Die Stammkultur wurde mindestens jeden zweiten Monat umgeimpft, 24 Stunden bei 37° C inkubiert und danach bei +4° C gelagert.

Die Züchtung der Zellmassen für die Röhrchen- und Agarplattenteste wurde gleich wie bei *Lactobacillus leichmannii* 313 auf „Micro Inoculum Broth (Difco)" vorgenommen.

Aufgabe und Ziel der vorliegenden Abhandlung.

Streptomyces griseus ist als ein Organismus bekannt, der eine Vielzahl biochemisch wichtiger Verbindungen, darunter verschiedene Antibiotika und Vitamin B_{12} synthetisieren kann. Es wurden aber bisher nur wenige Untersuchungen angestellt, die sich mit dem Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Biogenese von Vitamin B_{12} befassten. Bei industriellen Vitamin B_{12}-Gärungen werden billige Stickstoffquellen wie etwa Sojabohnenmehl, Erdnussmehl oder getrocknetes Mycel von Penicillingärungen verwendet. Kenntnisse über die Wirkung einzelner Aminosäuren könnte aber bei der Erforschung der Vitamin B_{12}-Synthese von grossem Nutzen sein. Untersuchungen über den Wert der genannten Stickstoffquellen für die Vitamin B_{12}-Erzeugung wurden im Institut für Lebensmittelchemie in Stockholm in den Jahren 1952—53 ausgeführt[18]).

Untersuchungen über die Abnahme des Gehaltes verschiedener Aminosäuren in technischen Fermentationslösungen während der

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Gärung, wurde von S. Ganguly und Mitarbeitern [19][20]) angestellt. Dabei zeigte es sich, dass gewisse Aminosäuren in den angewendeten Stickstoffquellen bevorzugt wurden.

Es war nun die Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit, die Bedeutung einiger Aminosäuren für das Wachstum und die Vitamin B_{12}-Bildung bei *Streptomyces griseus* N_zC_5, zu untersuchen.

Analysemethoden.

I. Bestimmung von Vitamin B_{12}.

a) Lochtestmethode:

Von den Stammkulturen werden die Organismen mit einer Platinöse zu 5 ml „Micro Inoculum Broth" in 15 ml Zentrifugenröhrchen, die mit je einer Glasperle versehen sind, geimpft. Die Röhrchen werden dann 12 Stunden bei 37° C inkubiert. Die gebildeten Zellen werden abzentrifugiert und zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Impfmaterial wird dann neuerdings in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschlemmt und mit Hilfe eines Coleman Universal Spektrophotometer Modell 11 unter Verwendung der Wellenlänge von 5000 Å auf die zu verwendende Zellkonzentration gebracht. Für *Lactobacillus leichmannii* 313 gibt 50 auf der Galvanometerskala die richtige Zellkonzentration an, was einer Konzentration von ungefähr 760 γ-Zelltrockensubstanz per ml entspricht. Die zweckmässige Konzentration für *Escherichia coli* 113—3 liegt bei 35 auf der Galvanometerskala, was ungefähr 1130 γ-Zelltrockensubstanz per ml entspricht. Das Impfmaterial darf nicht länger als eine Stunde in der physiologischen Kochsalzlösung aufbewahrt werden, da sonst rapide Zellautolyse eintritt.

Für jede Versuchsplatte werden 3 g Agar und 150 ml des jeweiligen Grundmediums in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gefüllt, und 15 Minuten bei 120° C und 1 atü autoklaviert. Danach werden die Kolben in einem Wasserbad auf 48° C gekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur wird jeder Kolben mit 5 ml der oben angeführten Zellsuspension versetzt. Bei Verwendung von *Escherichia coli* 113—3 als Testorganismus kommen ausserdem je Platte noch 15 ml einer 10%igen Glukoselösung dazu. Der Kolbeninhalt wird dann nach vorsichtigem Schütteln, bei dem keine Luftblasen gebildet werden sollen, auf die Platte gegossen. Diese besteht aus einer Glasscheibe, auf der ein 8 mm hoher, 170 mm breiter und 390 mm langer, vernickelter Messingrahmen liegt. Auf den Rahmen legt man nach erfolgtem Guss eine zweite Glasplatte als Schutz gegen Infektionen aus der Luft. Es ist wichtig, dass die Agarplatte während des Giessens horizontal liegt, da andernfalls die Agarschicht verschieden dick wird und dadurch Fehlresultate entstehen können.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Mit einem sterilen 9 mm Korkbohrer werden nach Erkalten der Platte nach vorher angefertigten Schemata Löcher ausgestanzt. In jede der dadurch entstehenden Vertiefungen werden mit einer Pipette 0,03 ml Probe- oder Standardlösung eingebracht. Die Standardlösungen wendet man gewöhnlich in fünf verschiedenen Konzentrationen an (0,001 γB_{12}/ml; 0,003 γB_{12}/ml; 0,01 γB_{12}/ml; 0,03 γB_{12}/ml und 0,1 γB_{12}/ml). 20 der 92 Vertiefungen jeder Platte werden für die Standardlösungen verwendet; während der Rest (72) für die Probelösungen reserviert ist. Jede Verdünnung der Proben wird in mindestens drei Vertiefungen pipettiert. Das Einpipettieren von Proben und Standardlösungen in die Platten soll möglichst schnell vor sich gehen, um dadurch die gleiche Diffusionszeit der Lösungen zu erhalten.

Als Standardsubstanz wurde kristallisiertes Cyanocobalamin von The Distillers Company, Speke, Liverpol, England verwendet. Die Standardlösungen wurden bei —20° C und vor Licht geschützt aufbewahrt, um dadurch eine Photolyse von Cyanocobalamin zu Hydroxocobalamin zu unterbinden.

Die Platten werden dann 12—24 Stunden bei 37° inkubiert und die gebildeten Zuwachszonen mit Hilfe eines Millimetermasses aus Zelluloid gemessen. Die Mittelwerte der Doppelproben werden errechnet und mit Hilfe von Standardkurven der Vitamin B_{12}-Gehalt der Proben ermittelt. Die Standardkurven erhält man durch Auftragen der Konzentration der Standardlösungen auf der Abszisse gegen die Ringdiameter auf der Ordinate.

b) Röhrchenmethode:

Die Zusammensetzung der Grundmedia und die Art der Bereitung des Inoculums ist dieselbe wie bei der Lochtestmethode.

Standard: Zu 20 × 150 mm Proberöhren fügt man 0,0 ml, 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml respektive 5,0 ml Standardlösung. In jede Proberöhre füllt man sodann 5,0 ml Grundmedium und füllt mit der entsprechenden Menge Wasser alle Proberöhren auf 10 ml auf.

Proben: Zu gleichen Röhren gibt man 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml respektive 5,0 ml Probelösung, fügt zu jeder derselben 5,0 ml Grundmedium und füllt mit der entsprechenden Menge Wasser auf 10 ml auf.

Die Inhalte werden gut gemischt. Die Röhren werden mit Wattepfropfen versehen und in einem vorgewärmten Autoklaven bei 120° C und 1 atü 5 Minuten sterilisiert. Danach kühlt man rasch in kaltem Wasser ab, um eine etwaige durch Überhitzung auftretende Färbung des Mediums zu vermeiden.

Nach dem Erkalten beimpft man jedes Röhrchen mit einem Tropfen des vorbereiteten Inoculums und inkubiert während 16—24 Stunden bei 37° C. Das Wachstum misst man mit Hilfe der Turbidität

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

in einem geeigneten Instrument (bei der vorliegenden Arbeit wurde ein Coleman Universal Spektrophotometer Modell 11 verwendet) bei einer Wellenlänge von 6600 Å.

Die Auswertung geschieht auf dieselbe Weise wie bei der Lochtestmethode, nur dass an Stelle der Ringdiameter die Trübungswerte treten. Eine eventuelle Eigenfarbe der Proben lässt sich mit Hilfe ungeimpfter Vergleichsansätze korrigieren.

c) Papierchromatographische Bestimmung verschiedener Vitamin B_{12}-Faktoren.

Zum Nachweis der verschiedenen Vitamin B_{12}-Faktoren wurde eine von Winsten und Eigen[21]) entwickelte Kombination von Papierchromatographie und Bioautographie angewendet.

Für die Anfertigung der Papierchromatogramme werden 17 × 50 cm grosse Bogen Whatman-Filterpapier Nr. 1 verwendet. Zum Aufbringen der Proben auf das Papier verwendet man Haarkapillaren. Die Proben werden auf eine mit Bleistift gezogene Linie gesetzt, welche 8 cm vom unteren Rand entfernt ist. Auf dem Punkt der 3,5 cm auf der Linie von links gesehen nach innen liegt, wird ein Tropfen einer Standardlösung, welche die in der Probe vermuteten Faktoren enthält, gesetzt. 2,5 cm weiter nach innen werden 1—2 Tropfen der ersten Probe gesetzt und so weiter in gleichen Zwischenräumen gleich grosse Mengen anderer Proben. Den Abschluss der Reihe bildet wiederum ein Tropfen der Standardlösung der 3,5 cm von der rechten Kante gesetzt wird. Untersucht man den Faktorengehalt von Fermentationslösungen, so muss man diese zuerst mit KCN versetzen, bei pH-6 autoklavieren und das Myzel abzentrifugieren. Nachdem alle Proben auf das Filterpapier gesetzt sind, hängt man dieses in eine feuchte Kammer. Das Lösungsmittel befindet sich in einem Schiffchen, in welches das Filterpapier mit der den Proben am nächsten liegenden Kurzkante eintaucht. Als Lösungsmittel wird ein Gemisch aus wassergesättigtem, sekundärem Butanol, 3% Eisessig und 25 mg KCN/l angewendet. Nach ungefähr 20 Stunden wird das Chromatogramm aus der feuchten Kammer genommen und in einem Luftstrom von 40° C getrocknet. Das Papier wird dann auf das Format 16 × 39 cm zugeschnitten und auf Agarplatten, vom gleichen Typ wie sie bei der Lochtestmethode angewendet werden, gelegt. Die Platten werden bei 37° C ca. 12 Stunden inkubiert. Dabei diffundieren die Zuwachsfaktoren vom Chromatogramm in die Agarschicht und man erhält unter den Stellen, an denen sich im Papierchromatogramm die Zuwachsfaktoren befanden, ein Bakterienwachstum in der Platte. Das Papier wird abgenommen, die Wanderungsstrecken der einzelnen Faktoren vom Startpunkt aus abgemessen und auf entsprechenden Vorlagen eingezeichnet.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

II. Andere Bestimmungen.

a) pH-Wertbestimmung.

Der pH-Wert der Proben wurde unmittelbar nach ihrer Entnahme mit Hilfe eines Radiometer-pH-Messgerätes Modell 22 bestimmt.

b) Zuckerbestimmung.

10 ml der Probe wurden abpipettiert und zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde dann in einen 100 ml Messkolben abdekantiert. Der Bodensatz des Zentrifugenröhrchens wurde mit ca. 10 ml Wasser aufgeschlemmt und abermals abzentrifugiert, das Waschwasser in den Messkolben übergeführt und das Zentrifugat auf 100 ml verdünnt, 10 ml der so erhaltenen Lösung wurden nach einer Modifikation der Schoorl-Methode [22]) auf reduzierende Zucker analysiert.

c) Myzeltrockengewichtsbestimmung.

10 ml der fermentierten Lösung wurden abzentrifugiert, und anschliessend 3mal mit destilliertem Wasser gewaschen und abzentrifugiert. Das gewaschene Myzel wurde dann aufgeschlemmt und im Porzellantiegel bei 65° C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

d) Totalstickstoffbestimmung.

Der Totalstickstoff wurde nach der von Andersen und Jensen modifizierten Kjeldahl-Methode bestimmt [23]).

Experimentelle Durchführung der Versuche.

Organismus.

Der zur Durchführung der vorliegenden Arbeit verwendete Organismus war ein Stamm von *Streptomyces griseus* N_zC_5 aus der Kultursammlung der biochemischen Fabrik Aktiebolaget Kabi, Stockholm. Dieser Stamm hat den Vorteil, dass er während seines Wachstums nur geringe Mengen von Antibiotika bildet, sodass bei Testung der Fermentationslösung auf Vitamin B_{12} die Testorganismen nicht beeinflusst werden. Die Vitamin B_{12}-Bildung ist bei diesem Stamm nicht so stark wie bei den technisch verwendeten Stämmen. Die Stammkultur wurde auf dem unten angegebenen Medium gezogen und jede 3. Woche umgeimpft. Der Organismus bildet nach einer Inkubation von 48 Stunden bei 25° C ein dichtes Luftmyzel. Die Kulturen wurden bei einer Temperatur von + 4° C aufbewahrt.

Anzuchtsmedium:

Bacto-Beef Extract . . .	3 g
Bacto-Peptone	5 g
Glycerin	20 ml
K_2HPO_4	1 g
Bacto-Agar	18 g
H_2O	1000 ml

pH 6,6—7,0

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H. Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Zusammensetzung des stickstoffreien Grundmediums.

Glukose	20 g
$K_2HPO_4 . 3 H_2O$	0,5 g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5 g
$CuSO_4 . 5 H_2O$	0,015 g
$MnSO_4 . 4 H_2O$	0,016 g
$ZnSO_4 . 7 H_2O$	0,03 g
$FeSO_4$ $7 H_2O$	0,025 g
$CaCl_2 . 2 H_2O$	0,05 g
$Co(NO_3)_2 . 6 H_2O$	0,005 g
H_2O	1000 ml

pH 7,0

Bei den Versuchen wurden verschiedene Stickstoffquellen verwendet. Der Gehalt an Stickstoff war je nach Versuch entweder 0,6 g oder 0,66 g Stickstoff per Liter Grundmedium.

A. Gärungen am Schütteltisch.

Bevor man dem Grundmedium Glukose zusetzt, wird dieses mit der für den Versuch vorgesehenen Stickstoffquelle versetzt und 15 Minuten bei 120° C und 1 atü autoklaviert. Die Glukose wird unter denselben Bedingungen separat sterilisiert. Die Trennung von Glukose und Grundmedium beim Autoklavieren ist notwendig, da sonst Zucker und Aminosäuren Verbindungen eingehen können, die biologisch nicht verwendbar sind und ausserdem das Medium braun färben. Lankford und Lacy[24]) haben gefunden, dass besonders Cystin, Methionin und andere für Mikroorganismen essentielle Aminosäuren durch Autoklavieren in Anwesenheit von Glukose zerstört werden. Nach dem Autoklavieren werden Grundmedium und Glukose gemischt. Die abgekühlte Lösung wird mit NaOH auf pH-7 justiert. Je 50 ml des Nährmediums werden nun in 300 ml Pyrex-Erlenmeyerkolben gefüllt, die mit Wattepfropfen verschlossen und im Dampf bei 100° C 30 Minuten lang nachsterilisiert werden. Nach dem Erkalten werden die Kolben unter sterilen Bedingungen mit Myzelstückchen des *Streptomyces griseus* N_zC_5 von Schrägagarkulturen beimpft und auf einem Schütteltisch (240 Umdrehungen/Min.) in einem Thermostatraum bei 28° ± 0,5° C inkubiert.

Im Folgenden werden während des Versuches jede 24. Stunde 2 Kolben aus dem Versuch gezogen. In diesen Kolben werden pH-Wert gemessen und Myzelltrockensubstanz bestimmt. Der Rest wird dann tiefgefroren und für die spätere Vitamin B_{12}-Bestimmung aufgehoben.

B. Gärungen in stationären Gefässen (à 5 l).

Gärapparatur:

Während der letzten Jahre wurde eine Anzahl kleiner Laboratoriumsgärapparate in der Literatur beschrieben. Die meisten sind

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at
3—30 Liter fassende mit Rührwerk versehene, geschlossene Gefässe. Um die bei der Gärung entstehende Wärme abzuleiten und die gewünschte Temperatur einhalten zu können, werden die Gärgefässe in Wasserbäder gestellt, die auf die vorgeschriebene Gärungstemperatur justiert werden.

Die bei den vorliegenden Untersuchungen verwendete Apparatur, die von A. B. Kabi gebaut und zur Verfügung gestellt wurde, hält sich im wesentlichen an die von Bartholomew und Mitarbeitern[25]) beschriebene. Eine Beilage mit Detailbeschreibung ist am Ende dieser Arbeit beigefügt.

Das Gärgefäss besteht aus einem 5 Liter fassenden Pyrex-Glaszylinder. Dieser ist in einer Höhe von 30 cm abgesprengt und plangeschliffen. Auf dem Gärgefäss liegt ein Deckel aus rostfreiem Stahl (S S 4 M M). Der Deckel ist an der Unterseite mit einer Vertiefung versehen, in die das Gärgefäss eingepasst wird. In dieser Vertiefung liegt ein Gummiring. Das Gärgefäss steht auf einer Bodenplatte aus rostfreiem Stahl. Eine Gummischeibe zwischen Gärgefäss und Bodenplatte gleicht den Druck gegen das Gefäss aus. Die Bodenplatte und der Deckel werden durch vier Stangen verbunden, welche mit der Bodenplatte verschweisst sind. Mit Flügelmuttern wird der Deckel gegen das Gärgefäss gepresst, sodass dadurch Dichtung erreicht wird.

Im Deckel ist das übrige Zubehör festgeschraubt. Dieses besteht aus einem Probenentnahmerohr, sowie Anordnungen für Luftzufuhr, Entlüftung, Zuführung von Wasser, Schaumdämpfungsmittel und Impfgut sowie einer Thermometertasche.

Im Zentrum des Deckels ist das Lager für den Umrührer festgeschraubt. Dessen Konstruktion geht aus Fig. 1 hervor. Am unteren Ende der Propellerachse sind zwei Propeller befestigt, deren Lage und Abstand zueinander beliebig verstellt werden kann. Ausserdem sind die Gärgefässe mit Turbularlamellen versehen, um die Mischung zu intensivieren.

Sterilisierung und Dosierung der Luft.

Die zur Durchlüftung verwendete Luft wird durch Glaswollfilter sterilisiert. Die zugeführte Luftmenge betrug zwischen 0,4 und 0,5 l/min per Liter Substrat und wurde mittels eines Strömungsmessers reguliert.

Sterilisierung von Gärgefäss und Substrat.

Um wegen der Grösse der Gärgefässe eine zu lange Sterilisierungszeit zu vermeiden, werden Glukose und andere Bestandteile getrennt, mit $^1/_3$ des Gesamtwassers während 15 Minuten bei 120° C und 1 atü sterilisiert. Die restlichen $^2/_3$ Wasser werden in das Gärgefäss gefüllt und dieses 45 Minuten bei 120° C und 1 atü autoklaviert. Nach

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at
dem Autoklavieren werden die Gärgefässe in das vorbereitete Wasserbad gestellt und fertigmontiert; d. h. die Propellerachsen werden an das Triebwerk angeschlossen, die Sterilluftzufuhr geregelt und die Temperatur des Wasserbades eingestellt. Nach Abkühlen wird durch die Impföffnung das separat sterilisierte Substrat zugefügt und nachdem der Gefässinhalt die Gärungstemperatur erreicht hat, ist dieser zur Impfung klar.

Impfung.

Entwicklungsstadium und Menge des Impfmaterials sind nicht nur für den Gesamtverlauf der Gärung, sondern auch für die Ausbeute von grosser Bedeutung. Lee und MacDaniel[26]) geben an, dass eine 10%ige Impfung mit jungem Impfmaterial bei Streptomycin-Gärungen gute Resultate gibt. Äusserst gering hingegen sind die Kenntnisse, wie das Impfmaterial beschaffen sein muss, um hohe Vitamin B_{12}-Ausbeuten zu erhalten. Hall[27]) gibt an, dass 5%ige Impfung mit 48 Stunden alten Schütteltischkulturen von *Streptomyces olivaceus* die besten Ergebnisse liefert. Bei *Streptomyces griseus* N_zC_5 erwies sich eine 20%ige Impfung mit einer 70 Stunden alten Schütteltischkultur als die günstigste. Das Impfmaterial befindet sich nach dieser Zeit teilweise in Sporenform und hat intensiven Erdgeruch. Als Anzuchtsmedium wurde das oben beschriebene Grundmedium mit Kaseinhydrolysat als Stickstoffquelle verwendet. Vor Beimpfen der Gärgefässe wurde das Impfmaterial vom Anzuchtsmedium abzentrifugiert und zweimal in steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Dämpfung der Schaumbildung.

Bereits während der ersten Stunden der Gärung kann intensive Schaumbildung auftreten. Dieser Schaum heftet sich an die Glaswand des Gärgefässes und bildet ein festes Dach über dem Rest des heftig zirkulierenden Substrates. Um dieser Schaumbildung erfolgreich zu begegnen, verwendet man in der Praxis oberflächenaktive Stoffe, die die Oberflächenspannung im Schaum erniedrigen und dadurch die Abrinnungsgeschwindigkeit erhöhen. Bei den hier angeführten Untersuchungen wurde als oberflächenaktives Mittel ein Gemisch aus Foamrex und Paraffinöl im Verhältnis 1:1 verwendet. Dieses Gemisch erwies sich als nicht toxisch und hatte eine ausgezeichnete Antischaumwirkung. Die stärkste Schaumbildung tritt während des intensivsten Wachstums und gegen Schluss der Gärung, wenn der pH-Wert über 8 steigt, auf.

Probenentnahme.

Um dem Verlauf der Gärung folgen zu können, werden jede 24. Stunde Proben entnommen. Durch den im Gärgefäss herrschen-

©Verlag Berger & Söhne, Wien; download unter www.biologiezentrum.at

den Überdruck wird die Fermentationslösung in das Probenentnahmerohr hochgepresst und in vorbereitete Polyenflaschen gefüllt. Um die Fermentationslösung, die sich vor der Probenentnahme im Probenentnahmerohr befindet und nicht dieselbe Zusammensetzung wie die Hauptmenge hat, zu entfernen, werden die ersten 10 ml verworfen. Der pH-Wert wird gemessen und Zucker und Myzeltrockengewicht bestimmt. Der Rest wird tiefgefroren. Nach Abschluss der Gärung wird bei allen Proben nach den bereits beschriebenen Methoden die Gesamtaktivität von Vitamin B_{12} bestimmt.

Anordnung und Ergebnisse der Versuche.

Beim ersten Versuch wurde als Stickstoffquelle vitaminfreies, säurehydrolysiertes Kasein (Difco 0288—01) mit einem Stickstoffgehalt von 8,1% verwendet. Dieses Kaseinhydrolysat enthielt alle Aminosäuren mit Ausnahme von Tryptophan, welches bei der sauren Hydrolyse zerstört worden war. Da jedoch Parallelversuche, bei denen 5% Tryptophan dem Kaseinhydrolysat zugegeben wurden, kein besseres Wachstum ergaben, ist die Abwesenheit dieser Aminosäure ohne Bedeutung.

Die Bildung von Myzel nimmt bis zum dritten Tage rapid zu, worauf eine ebenso rasche Autolyse eintritt.

Die im Medium vorhandene Glukose ist nach 4 Tagen gänzlich verbraucht.

Der Stickstoffgehalt des Mediums erreicht nach 2 Tagen ein Mininum, das bis zum fünften Tage besteht. Danach steigt der Stickstoffgehalt im Medium durch die zunehmende Autolyse wieder langsam an.

Die Hauptmenge von Vitamin B_{12} tritt erst nach Beginn der Autolyse auf und erreicht nach 216 Stunden mit 200 mγ/ml das Maximum. (Siehe Diagramm I.)

Als nächster Schritt wurden Versuche mit Aminosäuregemischen angestellt. Die Gemische wurden mit Hinsicht auf den strukturellen Aufbau der Aminosäuren zusammengestellt.

Gemisch I.
DL-α-Alanin
DL-Serin
DL-Cystin
DL-Methionin

Gemisch II (Diagramm II).
DL-Valin
DL-iso-Leucin
DL-Leucin

Gemisch III.
L-Phenylalanin
L-(—)-Tyrosin

Gemisch IV (Diagramm III).
DL-Asparaginsäure
L-Glutaminsäure

Gemisch V (Diagramm IV).
DL-Tryptophan
L-Histidin
L-(—)-Prolin
DL-Lysin

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Die Gemische I und III ergaben ein äusserst schlechtes Wachstum (< 0,4 mg Trockensubstanz/ml) und nur eine kleine Menge von Vitamin B_{12} (< 10 mγ/ml) wurde gebildet.

In den Gemischen II und IV war das Wachstum ausgezeichnet und die gebildeten Vitamin B_{12}-Mengen besonders im letzteren hoch. Die erreichte Vitamin B_{12}-Menge betrug bei Gemisch IV 320 mγ/ml.

Im Gemisch V erreichte der Zuwachs nach 120 Stunden ein Maximum, bei dem die Myzeltrockensubstanz 0,9 mg/ml und die gebildete Vitamin B_{12}-Menge 22 mγ/ml betrug.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass gewisse Aminosäuren eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum und die Vitamin B_{12}-Bildung haben, während andere inaktiv sind oder sogar hemmend wirken. Wie spätere Versuche zeigen, gibt es aber einige Aminosäuren, die nur ein schwaches Wachstum erlauben, aber in Kombination mit einer Aminosäure, die das Wachstum stimuliert, selbst aber ein schlechter Vitamin B_{12}-Bildner ist, gute Vitamin B_{12}-Ausbeuten geben. Zuwachs und Vitamin B_{12}-Bildung gehen also nicht parallel.

Im Folgenden werden Gärungen besprochen, bei denen das Grundmedium jeweils nur eine einzige Aminosäure als Stickstoffquelle besass. Die betreffenden Aminosäuren waren: Glycin, L-Glutaminsäure, DL-Asparaginsäure, DL-Valin, DL-Leucin, DL-iso-Leucin, L-Cystin, L(+)-Arginin und DL-Serin.

Die untenstehenden Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass sehr grosse Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Aminosäuren bestehen, sowohl mit Hinsicht auf das Wachstum als auch auf die Vitamin B_{12}-Bildung. Eine allgemeine Parallelität zwischen Wachstum und B_{12}-Bildung besteht, wie schon erwähnt, nicht.

Glycin und Glutaminsäure geben bei gutem Wachstum grosse Mengen Vitamin B_{12}. Asparaginsäure fördert zwar das Wachstum, jedoch ist die Ausbeute an Vitamin B_{12} sehr niedrig.

Bei Valin ist es umgekehrt. Hier treten bei geringem Wachstum verhältnismässig grosse Mengen Vitamin B_{12} auf. Manche Aminosäuren wie z. B. DL-Serin, geben sowohl schlechtes Wachstum als auch schlechte Vitamin B_{12}-Bildung.

Diagramm	Aminosäure	Maxim. Myzeltrockengew. in mg/ml	Maxim. Vit. B_{12}-Menge in mγ/ml
V	Glycin	3,1	360
VI	L-Glutaminsäure	4,5	400
VII	DL-Asparaginsäure	2,6	60
	DL-Valin	0,4	20
	DL-Leucin	0,4	7
	DL-iso-Leucin	0,3	6
	L-Cystin	0,3	15
	L(+)-Arginin	0,4	10
	DL-Serin	0,3	5

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Um eine etwaige Wirkung in Bezug auf die Vitamin B_{12}-Bildung bei solchen Aminosäuren, welche das Wachstum nicht stimulieren, untersuchen zu können, wurde nach einer anderen Stickstoffquelle als Aminosäuren gesucht. Diese sollte nur das Wachstum, nicht aber, oder nur zu geringem Masse die Vitamin B_{12}-Bildung fördern. Anorganischer Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat und Kaliumnitrat sowie Harnstoff, konnte aber vom *Streptomyces griseus* N_zC_5 nicht verwertet werden. Es erschien deshalb angebracht, für die weiteren Untersuchungen DL-Asparaginsäure als Grundstickstoffquelle zu verwenden. Mit DL-Asparaginsäure wird nämlich, wie aus den oben besprochenen Versuchen hervorgeht, ein so gutes Wachstum erreicht, dass die für die Vitamin B_{12}-Bildung notwendigen Enzymsysteme aufgebaut werden können. Wird dann eine für die Vitamin B_{12}-Synthese geeignete Aminosäure wie Serin (siehe unten), zugesetzt, erfolgt ein Ansteigen des Vitamin B_{12}-Gehaltes im Medium. Es wurde deshalb bei den folgenden Versuchen die Hauptmenge des Stickstoffes in Form von DL-Asparaginsäure zugegeben, während geringere Stickstoffmengen von anderen Aminosäuren zugesetzt wurden.

Bei diesen Aminosäure-Kombinationen wurden 0,66 g Stickstoff per Liter Grundmedium verwendet. 0,6 g Stickstoff entfielen auf DL-Asparaginsäure, während die restlichen 10% des Stickstoffes von der jeweils zu untersuchenden Aminosäure stammten. Die Hauptmenge des Stickstoffes wird nämlich für das Wachstum verwendet, während bei der relativ stärksten Vitamin-Bildung die gebildete Vitamin B_{12}-Menge nur 0,01—0,05% der Myzeltrockensubstanz ausmacht. Als Vorversuch wurde eine Gärung mit nur DL-Asparaginsäure durchgeführt, bei welcher der Stickstoffgehalt des Mediums 0,66 g betrug.

Es zeigte sich, dass die Erhöhung der Stickstoffkonzentration um 10% weder auf das Wachstum noch auf die Vitamin B_{12}-Bildung Einfluss hatte. Bei einer eventuellen Beeinflussung der Vitamin B_{12}-Bildung durch andere Aminosäuren kann es sich daher nicht um eine unspezifische Beeinflussung durch Erhöhung der Stickstoffkonzentration handeln, sondern es muss eine wirkliche stimulatorische Wirkung vorliegen.

Die Aminosäuren, die auf eventuelle stimulatorische Wirkung untersucht wurden, waren: Glycin, L-Glutaminsäure, DL-Leucin, DL-Valin, L(+)-Arginin, ß-Alanin, L(—)-Prolin, DL-Serin, L(—)-Tryptophan, DL-Lysin, L-Histidin·HCl.

Aus den Diagrammen VIII—XVIII ist zu ersehen, dass von den elf untersuchten Aminosäuren Glycin, L-Glutaminsäure, DL-Valin, L(—)-Prolin, DL-Serin, L(—)-Tryptophan, DL-Lysin und L-Histidin·HCl die Vitamin B_{12}-Bildung stimulieren.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Von diesen stimulierenden Aminosäuren haben Glycin und DL-Serin eine besonders starke Wirkung; sie erhöhen den Vitamin B_{12}-Gehalt im Medium auf das Doppelte. Die anderen wirksamen Aminosäuren erhöhen diesen um etwa 50%. DL-Leucin, L(+)-Arginin und β-Alanin erwiesen sich als wirkungslos.

Bei den Versuchen wurde DL-Asparaginsäure als wachstumsstimulierende Aminosäure verwendet. Bei einigen Vorversuchen wurde die Anwendbarkeit von D- bzw. L-Asparaginsäure untersucht. Es zeigte sich, dass D-Asparaginsäure nicht verwendbar ist.

Diskussion.

Die vorliegenden Resultate zeigen, dass zwischen Wachstum und Vitamin B_{12}-Bildung kein direkter Zusammenhang besteht. Ein Gemisch aus gleichen Teilen DL-Valin, DL-iso-Leucin und DL-Leucin gibt z. B. ein gutes Wachstum aber nur schlechte Vitamin B_{12}-Ausbeute. Andererseits geben gewisse Aminosäuren wie z. B. Serin, wenn als alleinige Stickstoffquelle verwendet, fast kein Wachstum und keine Vitamin B_{12}-Bildung. In Kombination mit DL-Asparaginsäure erhält man gutes Wachstum und hohe Vitaminmengen.

Für die Bildung von Vitamin B_{12} scheint Wachstum nur insofern von Bedeutung zu sein, als es zur Bildung der vitaminaufbauenden Enzymsysteme notwendig sein dürfte.

Man könnte sich vorstellen, dass Vitamin B_{12} schon vor der Autolyse in grossen Mengen im Myzel vorhanden wäre, aber in einer solchen Weise an dieses gebunden, dass es mit den angewandten Analysenmethoden nicht nachgewiesen werden konnte. Es wurden daher Versuche angestellt, bei denen das Myzel zum Zeitpunkt des grössten Wachstums einer Extraktion mit iso-Propanol oder einer Behandlung mit proteolytischen Enzymen wie Papain und Lysozym unterzogen wurde. Die dabei im Myzel nachgewiesenen Vitaminmengen (< 4 mγ/ml) standen in keinem Verhältnis zu jenen, die nach der Autolyse (60—400 mγ/ml) festgestellt wurden. Es muss daher angenommen werden, dass die Hauptmenge an Vitamin B_{12} erst nach Eintritt der Autolyse gebildet wird. Die Bildung des Vitamin B_{12}-Moleküls dürfte in den autolysierenden Zellen erfolgen.

Die Werte in der vorliegenden Tabelle sind relativ und auf die Gärungen mit Kaseinhydrolysat als Stickstoffquelle bezogen. Aus diesen ist zu ersehen, dass besonders drei Aminosäuren deutlichen Einfluss auf die Vitamin B_{12}-Bildung besitzen. Es sind dies, wie schon früher mehrmals erwähnt, Glycin, Serin und Glutaminsäure.

Glycin kann mit durch Coenzym A „aktiviertes" Succinat aus aus dem Krebs-Zyklus zu α-Amino-β-keto-Adipinsäure kondensiert werden, welche durch Dekarboxylierung in δ-Aminolävulinsäure übergeht. Es ist wahrscheinlich, dass diese, ähnlich wie bei der Por-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Diagramm	Stickstoffquelle			Maxim. Myzeltrockengew. *)	Maxim. B_{12}-Menge *)
I	Kaseinhydrolysat			100	100
	Gemisch I			16	20
II	Gemisch II			60	15
	Gemisch III			8	5
III	Gemisch IV			119	160
IV	Gemisch V			21	10
V	Glycin			95	180
VI	L-Glutaminsäure			105	125
VII	DL-Asparaginsäure			62	30
	DL-Valin			8	10
	L(+)-Arginin			8	5
	DL-Leucin			8	2,5
	DL-iso-Leucin			6	2
	L-Cystin			7	10
	DL-Serin			7	3,5
VII	DL-Asparaginsäure			62	30
VIII	Komb. I	(Asparaginsr.	+ Glycin)	71	50
IX	Komb. II	(Asparaginsr.	+ L-Glutaminsr.)	69	50
X	Komb. III	(Asparaginsr.	+ DL-Leucin)	69	40
XI	Komb. IV	(Asparaginsr.	+ Dl-Valin)	60	50
XII	Komb. V	(Asparaginsr.	+ L(+)-Arginin)	52	35
XIII	Komb. VI	(Asparaginsr.	+ β-Alanin)	81	30
XIV	Komb. VII	(Asparaginsr.	+ L(—)-Prolin)	81	50
XV	Komb. VIII	(Asparaginsr.	+ DL + Serin)	67	65
XVI	Komb. IX	(Asparaginsr.	+ L(—)-Tryptophan)	64	50
XVII	Komb. X	(Asparaginsr.	+ DL-Lysin)	62	50
XVIII	Komb. XI	(Asparaginsr.	+ L-Histidin · HCl)	64	50

*) Relative Werte auf Kaseinhydrolysat bezogen.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

phyrinsynthese auch bei der Synthese von Vitamin B_{12} zum Aufbau des porphyrinähnlichen Zentralteiles des Moleküls herangezogen wird [28]). Ferner kann das α-Kohlenstoffatom des Glycins zur Synthese von Methylgruppen verwendet werden. Dass ein kleiner Zusatz (10%) von Glycin zu Asparaginsäure (Kombination I) keine grössere Vitamin B_{12}-Ausbeute gibt, beruht vermutlich darauf, dass Glycin ausser zur Vitamin B_{12}-Synthese und zur Bildung von Methylgruppen noch zu anderen Synthesen verwendet wird und dadurch die zugegebene Menge zu klein ist, um eine maximale Vitamin B_{12}-Ausbeute zu erhalten.

Die hohe Vitamin B_{12}-Ausbeute bei Gärungen mit Serinzusatz zum Asparaginsäuremedium ist wahrscheinlich auf eine Doppelwirkung desselben zurückzuführen. Bei der Spaltung von Serin entsteht Glycin [32]), das, wie oben bereits angeführt, zum Aufbau des porphyrinähnlichen Teiles des Vitaminmoleküls verwendet werden kann, und ein 1-Kohlenstoffragment. Dieses Fragment — wahrscheinlich handelt es sich um Formaldehyd oder Formiat [29, 30]) — wird bei biologischen Umsetzungen zur Synthese von Methylgruppen verwendet [31]). Diese Methylgruppen können direkt an das Ring-C-Atom gebunden werden wie es z. B. bei der biologischen Methylierung von Uracil zu Thymin geschieht. Es ist daher nicht unmöglich, dass dieses Fragment bei der Biosynthese des Vitamin B_{12} mitwirkt.

L-Glutaminsäure kann deaminiert und mit Hilfe von Diphosphorpyridin-Nukleotid (DPN+) in α-Ketoglutarsäure übergeführt werden [46, 47, 48, 49, 50]). α-Ketoglutarsäure kann dann als Intermediär des Krebs-Zyklusses in Succinyl Coenzym A übergeführt werden, das wieder seinerseits mit Glycin über die bereits schon vorhin genannten Zwischenprodukte den Zentralteil des Vitamin B_{12} Moleküls aufbauen kann [28]). Eine weitere grosse Rolle spielt wohl auch die Sonderstellung, welche die Glutaminsäure im Bezug auf De- und Transaminierung innerhalb der Aminosäuren einnimmt [47, 48, 49, 50, 51, 52]).

Zusammenfassung.

Ein Nährsubstrat mit jeweils geänderter Stickstoffquelle (Aminosäuren) wurde mit *Streptomyces griseus* N_zC_5 vergoren und die gebildeten Vitamin B_{12}-Mengen mit Hilfe von *Escherichia coli* 113-3 und *Lactobacillus leichmannii* 313 bestimmt. Bei der Analyse von Vitamin B_{12} wurden die Lochtest- und Röhrchentestmethode angewendet. Die Gärungen wurden in Erlenmeyerkolben am Schütteltisch und in Gärgefässen durchgeführt. Jeder Versuch erstreckte sich über einen Zeitraum von 240 Stunden, wobei jede 24. Stunde für die Bestimmung von Vitamingehalt, Myzeltrockensubstanz, Stickstoffgehalt und pH-Wert Proben entnommen wurden.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Das Wachstum des *Streptomyces griseus* N_zC_5 erreicht nach 3—6 Tagen das Maximum. Danach tritt rapide Autolyse ein. Vitamin B_{12} wird erst nach Eintritt der Autolyse gebildet, was durch Versuche, die mit Hilfe von proteolytischen Enzymen durchgeführt wurden, nachgewiesen werden konnte.

Zwischen Wachstum und Vitamin B_{12}-Bildung besteht keine direkte Parallelität; es scheint aber ein gewisses Wachstum notwendig zu sein, damit die vitaminaufbauenden Enzymsysteme gebildet werden können.

Von den verwendeten Aminosäuren förderten Glycin, L-Glutaminsäure und DL-Serin) bei den beschriebenen Untersuchungen eine deut-Gegensatz zu den beiden erstgenannten Aminosäuren erzeugte DL-Asparaginsäure nur eine geringe Vitamin B_{12}-Menge. Es wurde daher DL-Asparaginsäure bei der Untersuchung der Vitamin B_{12}-Bildung von Aminosäurekombinationen als wachstumsfördernde Grundstickstoffquelle verwendet.

Von den untersuchten Aminosäuren, DL-Asparaginsäure, DL-Valin, L(+)-Arginin, DL-Leucin, DL-iso-Leucin, L-Cystin, β-Alanin, L-Prolin, (L(—)-Tryptophan, DL-Lysin, L-Histidin . HCl, L-Phenylalanin, L-(—)-Tyrosin, DL-Methionin, Glycin, L-Glutaminsäure und DL-Serin, hatten nur die drei letztgenannten (Glycin, L-Glutaminsäure und DL-Serin) bei den beschriebenen Untersuchungen eine deutlich fördernde Wirkung auf die Vitamin B_{12}-Bildung. Die stimulierende Wirkung dieser drei Aminosäuren auf die Vitamin B_{12}-Bildung und deren Rolle bei der Synthese von Intermediären des „Krebs-Zyklusses" und bei der Bildung von Porphyrin, sowie bei den Transmethylierungsreaktionen wurde in der Diskussion näher besprochen.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Harry Lundin und Herrn Dozenten Dr. Niels Nielsen meinen ergebensten Dank für die Anregung und stete Förderung meiner Arbeit auszusprechen.

Herrn Professor Dr. Karl Höfler danke ich für die freundliche Aufnahme derselben und für die Übernahme der Druckkosten.

Dem schwedischen technischen Forschungsrat danke ich für die grosszügige finanzielle Unterstützung.

Literaturverzeichnis.

1) Minot G. R. und Murphy W. P. J., Am. Med. Ass., **87** (1926) 470.
2) Shorb M. S. J. Bact., **53** (1947) 669.
3) Shorb M. S. Science, **107** (1948) 397.
4) Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., und Folkers K., Science, **107** (1948) 396.
5) Lester Smith E., Nature., **161** (1948) 638.
6) Lester Smith E. L. und Parker L. F. I., Biochem. J., **43** (1948) VIII.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

7) Hodgkin D. C., Pickworth J., Robertson J. H., Trueblood K. N., Prosen R. J., und White I. G., Nature **176** (1955) 325.
8) Bonnet R., Cannon I. R., Johnson A. W., Sutherland I., Todd A. R. und Lester Smith, E., Nature **176** (1955) 328.
9) Hodgkin D. C., Kamper I., Mackay M., Pickworth I., Trueblood K. N., White I. G. Nature **178** (1956) 64.
10) Kaczka E. A., Wolf D. E. und Folkers K. J. Am. Chem. Soc. **71** (1949) 1514.
11) Ford I. E., Holdsworth E. S., und Kon S. K. Biochem. J. **59** (1955) 86.
12) Zucker T. F. und Zucker L. M., Arch. Biochem. **16** (1948) 45.
13) Cary, C. A., Hartman, A. M., Dryden, L. P., und Likely G. D., Federation Proc. **5** (1946) 128.
14) Weber E. M., Luther H. G., und Reynolds W. M., WHO Monograph Series No. 10 Geneve (1952) 149.
15) Krieger C. H., I. Ass. Off. Agric. Chem. **35** (1952) 726.
16) Hoffmann C. E., Stokstad E. L. R., Franklin A. L. und Jukes T. H. J. Biol. Chem. **176** (1948) 1465.
17) Davis B. D. und Mingioli E. S., J. Bact. **60** (1950) 17.
18) Sjöström A. G. M. und Lundin H. Private Mitteilungen.
19) Ganguly S., Ganguly N. C. und Roy S. C. J. Sci. Ind. Research **13 B** (1954) 847.
20) Ganguly S., und Roy S. C., J. Sci. Ind. Research **14 C** (1955) 162.
21) Winsten W. A., und Eigen E., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **67** (1948) 513.
22) Tekniska meddelanden. Svenska Pappers och Cellulosa Ingeniörsföreningen. C. C. A. 11 (1942).
23) Andersen A. C. und Norman Jensen B. Zur Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl. Z. Anal. Chem. **67** (1925) 427.
24) Lankford C. E. und Lacy H. Meeting Soc. Am. Bact. 1949.
25) Bartholomew W. H., Karow E. O. und Sfat M. R. Ind. Eng. Chem. **42** (1950) 1827.
26) Lee S. B. und Mac Daniel L. E. A. C. S. 116th Meeting.
27) Hall H. H. Mitteilungen von N. R. R. L., Fermentation Division. „Not for publication".
28) Shemin D., Corcoran J. W., Rosenblum C. und Miller I. M. Science **124** (1956) 272.
29) Elwyn D. und Springson D. B. J. Amer. Chem. Soc. **72** (1950) 3317.
30) Elwyn D. und Springson D. B. J. Biol. Chem. **184** (1950) 465.
31) Arnstein H. R. V. Symp. biochem. Soc. No. 13 (1955) 92.
32) Knoop F. Z. f. physiol. Chemie **89** (1914) 151.
33) Dion H. W., Calkins D. G., und Pfiffner J. J. J. Am. Chem. Soc. **74** (1952) 1108.
34) Pfiffner J. J., Dion H. W., Calkins D. G. Fed. Proc. **10** (1952) 269.
35) Dion H. W., Calkins D. G., und Pfiffner J. J. J. Am. Chem. Soc. **76** (1954) 948.
36) Pfiffner J. J., Dion H. W., Calkins D. G. Fed. Proc. **13** (1954) 274.
37) Lewis U. J., Tappan D. V., und Elvehjem C. A. J. Biol. Chem. **194** (1952) 539.
38) Lewis U. J., Tappan D. V., und Elvehjem C. A. J. Biol. Chem. **199** (1952) 517.
39) Wijmenga H. G. Onderzoekingen over vitamine B_{12} en verwante factoren. Thesis, University of Utrecht (1951).

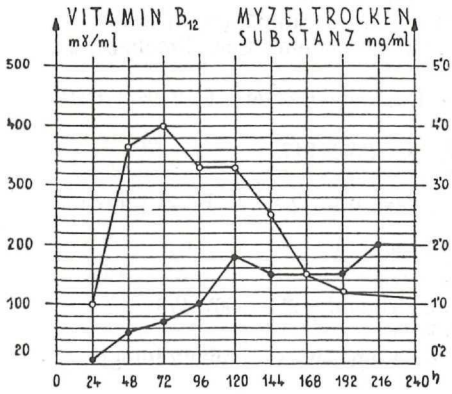
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

40) Ericson, L.-E. und Lewis L. Ark. Kemi **6** (1953) 427.
Ericson, L.-E. Acta Chem. Scand. **7** (1953) 703.
41) Ford I. E. und Porter I. W. G. Brit. J. Nutrition **7** (1953) 326.
42) Brown F. B. und Smith E. L. Proc. Biochem. Soc. Biochem. J. **56** (1954) XXXIV.
43) Friedrich W., und Bernhauer K. Angew. Chem. **65** (1953) 627; **66** (1954) 776—780.
44) Neujahr H. Y. Acta Chem. Scand. **10** (1956) 917.
45) Smith E. L. et al. Biochem. J. **62** (1956) 14 P.
46) von Euler H., Adler E., Günther G., und Das N. B. Z. physiol. Chem. **254** (1938) 61.
47) Cohen P. P. Biochem. J. **133** (1939) 1478.
48) Cohen P. P. Biochem. J. **136** (1940) 565.
49) Meister A., und Tice S. V. J. Biol. Chem. **187** (1950) 173.
50) Meister A. J. Biol. Chem. **200** (1953) 571.
51) Braunstein A. E., und Kritsmann M. G. Enzymiologia **2** (1937) 129.
52) Braunstein A. E., und Kritsmann M. G. Nature **140** (1937) 503.
53) Dellweg H., Becher E. und Bernhauer K. Biochem. Z. Bd. **327** (1956) 422—449; Bd. **328** (1956) 81—100.
54) Hoover S. R., Jasewicz L., Pepinsky I. B., und Porges N. Sewage and Ind. Wastes **24** (1952) 38.
55) Sjöström A. G. M., Neujahr H. Y. und Lundin H. Acta Chem. Scand. **7** (1953) 1036—1040.

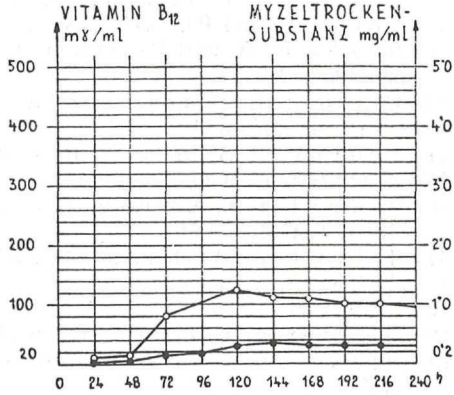
Zeichenerklärung zu den Diagrammen I—XVIII.

—o—o— (Linien mit Kreisen): Myzeltrockensubstanz mg/ml.
—.—.— (Linien mit Punkten): Vitamin B_{12} mg/ml.

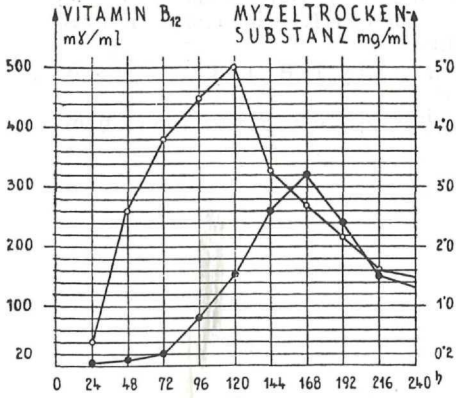
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



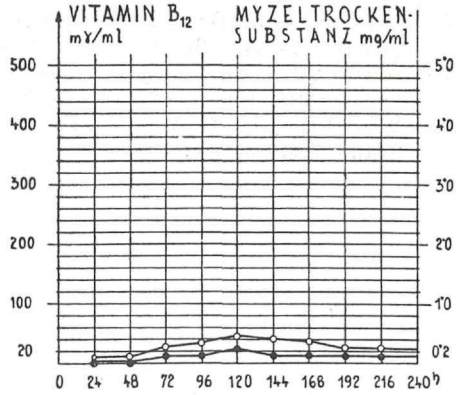
I



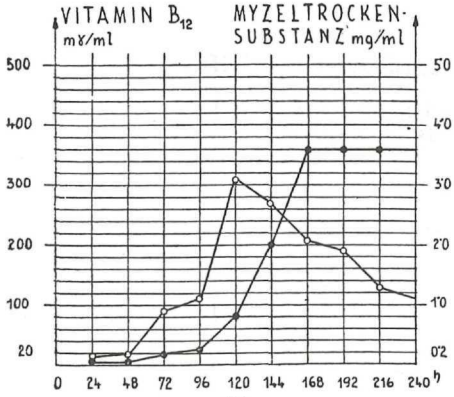
II



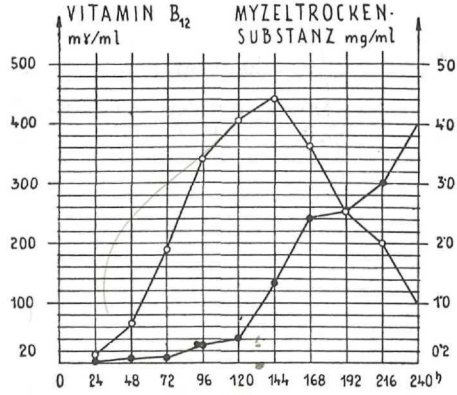
III



IV

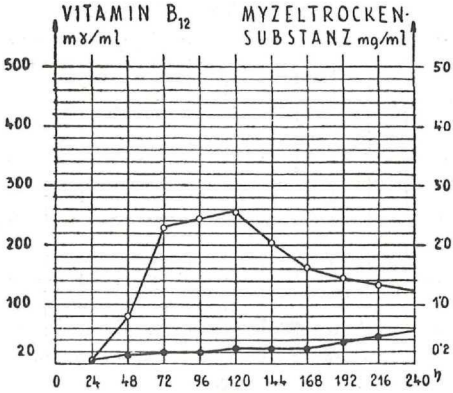


V

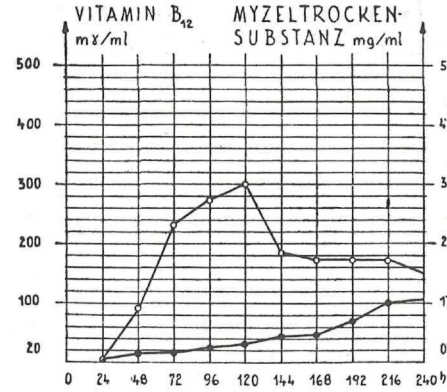


VI

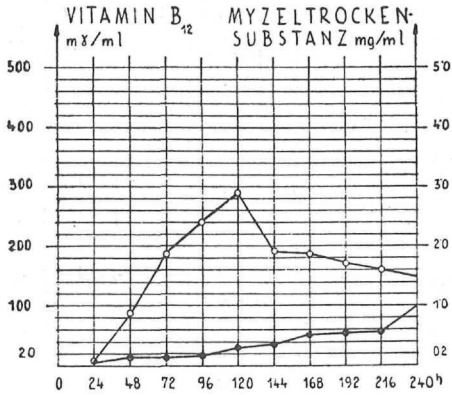
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



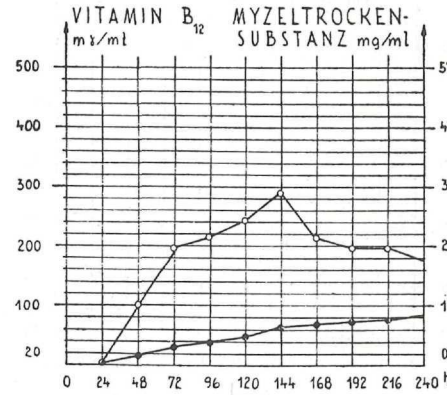
VII



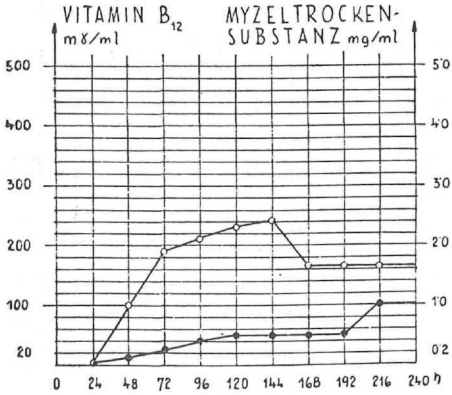
VIII



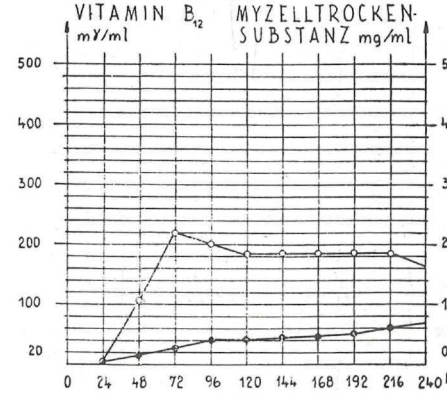
IX



X

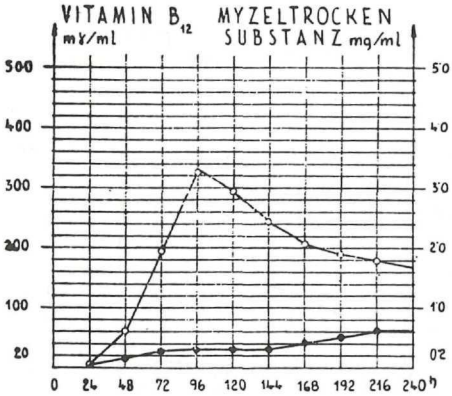


XI

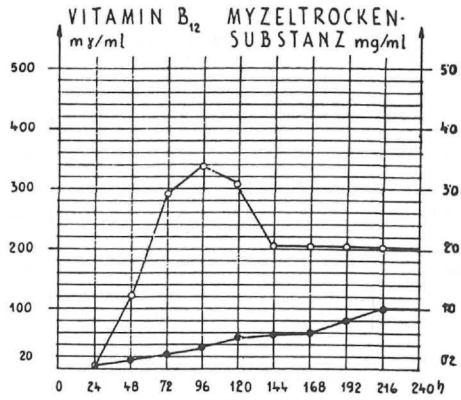


XII

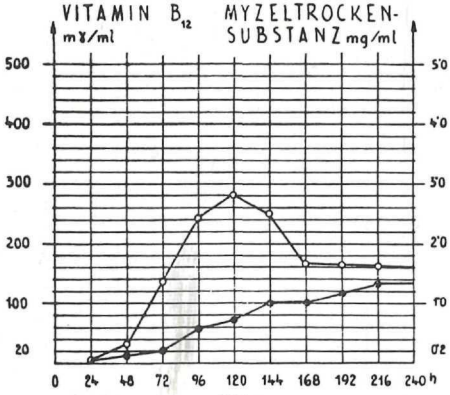
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



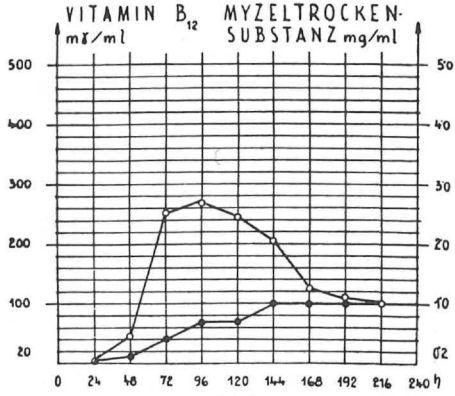
XIII



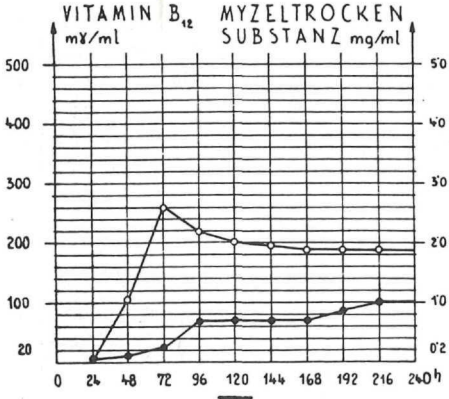
XIV



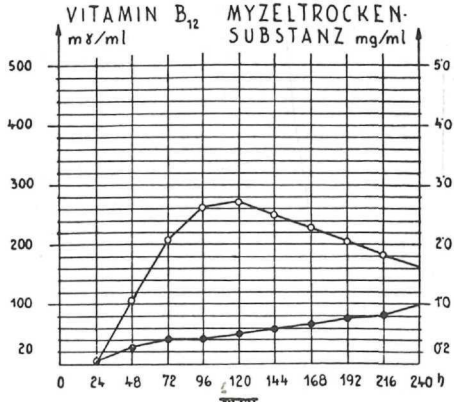
XV



XVI



XVII



XVII

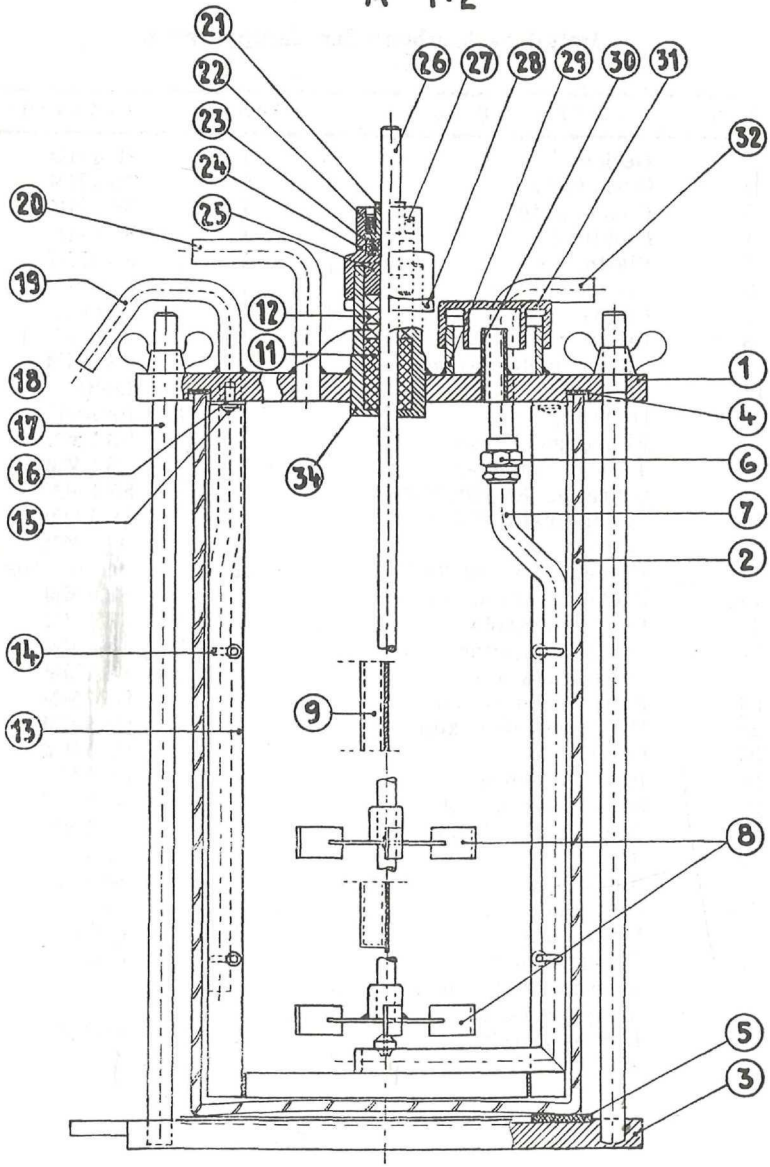
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Detailbeschreibung der Gärapparatur.

Det.	Benennung	Anzahl	Material
1	Deckel	1	SS 4 MM
2	Gärgefässe	1	SS 4 MM
3	Bodenplatte	1	SS 4 MM
4	Dichtung	1	SS 4 MM
5	Platte	1	SS 4 MM
6	Rohrkupplung	1	Pyrex
7	Luftverteiler	1	Gummi
8	Propeller	1	Gummi
9	Thermometertasche	2	SS 4 MM
11	Hauptlager	1	Isolit
12	Dichtung		Palmetto
13	Führungsschiene	4	SS 4 MM
14	Turbularlamellen	4	SS 4 MM
15	Schraube KS 3/16" × 8	4	SS 4 MM
16	Beilagscheibe 3/16"	4	SS 4 MM
17	Stange	4	SS 4 MM
18	Flügelmutter W 3/8"	4	verchr. Messing
19	Probeentnahmerohr	1	SS 4 MM
20	Entlüftungsrohr	1	SS 4 MM
21	Achsensteuerung	1	SS 4 MM
22	Achsenlager oben	1	SS 4 MM
23	Achsenlager unten	1	SS 4 MM
24	Dichtungshülsenkopf	1	SS 4 MM
25	Gland	1	SS 4 MM
26	Propellerachse	1	SS 4 MM
27	Segersicherung 21	1	SS 4 MM
28	Gegenmutter R 7/8"	1	SS 4 MM
29	Rohe	1	SS 4 MM
30	Impföffnung	1	SS 4 MM
31	Schraubdeckel	1	Isolit
32	Luftzufuhr	1	Isolit
33	öffnungenn für Wasser- und Schaumdämpferzusatz	1	Isolit
34	Dichtungshülse	2	SS 4 MM

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

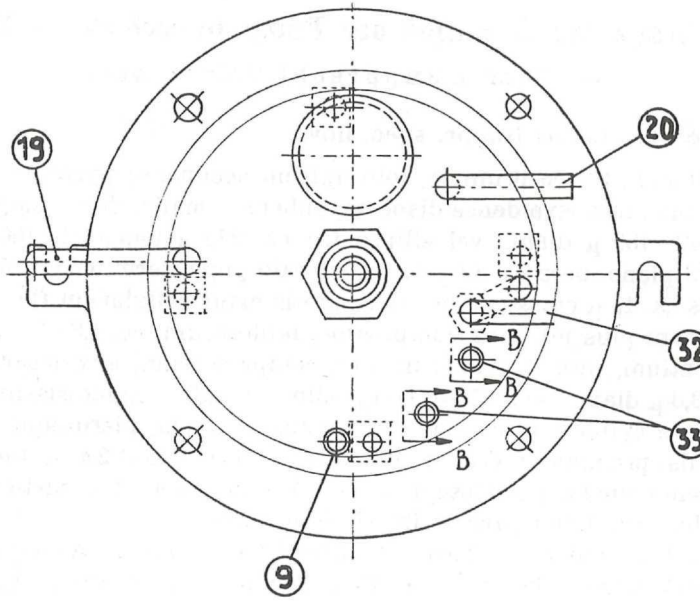
GÄRAPPARATUR
M 1:2

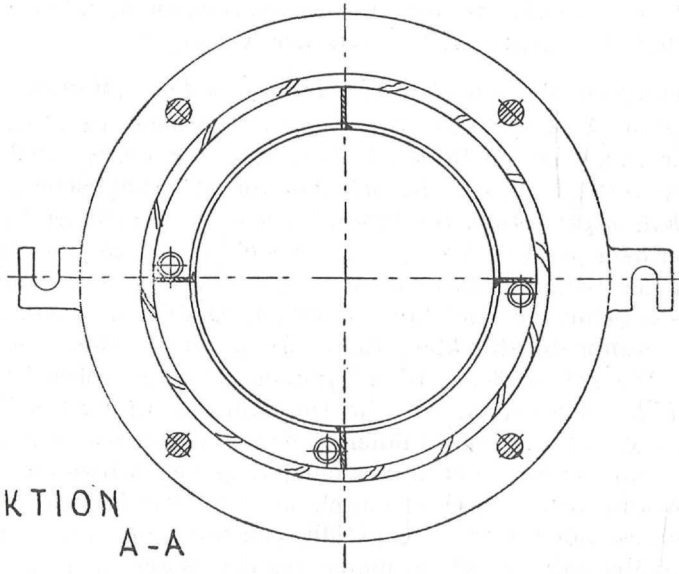


©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

GÄRAPPARATUR

M 1:2





SEKTION
A-A

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Sydowia

Jahr/Year: 1957/1958

Band/Volume: 11

Autor(en)/Author(s): Kurz Wolfgang G.

Artikel/Article: Der Einfluß einer Anzahl Aminosäuren auf die Biosynthese von Vitamin B12 durch Streptomyces-griseus NZC5. 389-423