

Die Wuchsstoffe bei *Oospora lactis* (Fres.) Sacc.¹⁾

Von Karl Wilhelm Kuchar (Wien).

1. Einleitung.

Die wechselseitigen Beziehungen der Organismen können sowohl durch Umweltfaktoren wie auch durch die gegenseitige Beeinflussung der in einer Biocönose lebenden Organismen bestimmt werden. Bei den Flechten, auf die sich das Wort Symbiose zunächst allein bezog, wird vielfach das Wachstum der Pilze offenbar durch die Algen überhaupt erst ermöglicht. Hier sind die Beziehungen vor allem ernährungsphysiologischer Natur. Die Alge liefert organische Stoffe, die dem Pilz zugute kommen. Über den Nutzen, den die Algen bei diesem Zusammenleben ziehen, herrscht bis jetzt noch nicht vollständige Klarheit.

Denkt man sich nun den Fall, dass zwei Organismen zeitlich getrennt voneinander leben, wobei der erstere die Existenzbedingungen für den zweiten erst schafft oder zumindest erträglicher gestaltet, so haben wir den Fall einer typischen Metabiose vor uns.

Coenobiose und Metabiose sind ungemein stark in der Natur verbreitet und wir treffen sie überall dort, wo Organismen verschiedener systematischer Stellung beisammen leben. Man fand, dass auch die Individuen einer Spezies sich oft weitgehend gegenseitig beeinflussen können. Allerdings muss keineswegs immer eine Wirkung eines Lebewesens auf ein anderes ausgehen.

Besonders flüssige Medien, als Biotope aufgefasst, bieten für das Studium der Wechselbeziehungen der Organismen sehr prägnantes Material, denn hier können die Stoffwechselprodukte, die nach aussen von den Organismen ausgeschieden werden, direkt auf benachbarte Organismen einwirken.

Wird etwa Milch nicht sterilisiert, so stellt sich alsbald eine Reihe von Organismen ein. Wenn man beachtet, dass die Milch aus Lactose, Kasein und Fett in fast gleichen Teilen neben wenig Salzen und etwa 90% Wasser zusammengesetzt ist, so erhellt, dass dieses

¹⁾ Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Alexander Janke, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten und ergebensten Dank aussprechen für die Anregung zu vorliegender Arbeit, welche während meiner Assistentenzeit an der Lehrkanzel für Biochemische Technologie der Technischen Hochschule Wien ausgeführt wurde.

Milieu einen durchaus zusagenden Nährboden für verschiedene Bakterien und Pilze darstellt. Und so gestaltet sich das Leben in der Milch zu einem übergeordneten Gefüge, in welchem die Organismen zueinander in bestimmten Wechselbeziehungen stehen. So kann auch die Milch als ein durch bestimmte Lebensvereine charakterisierter Biotop, als echte Biocönose mit ihrer Mikroorganismengesellschaft bezeichnet werden. Kennen wir doch eine Reihe von Mikroorganismen, die als Milchbewohner geradezu charakterisiert worden sind. Auch die chemischen Umwandlungsprozesse, denen die Milch durch die Einwirkung der milchbewohnenden Organismen unterworfen wird, sind an und für sich und in ihrem Verlauf charakteristisch. Beim Erhalten des biocönotischen Gleichgewichts treten wohl die ernährungsphysiologischen Faktoren stark in den Vordergrund. Nicht nur die Stoffwechselprodukte schlechthin, die in die Milch gelangen, sind von Bedeutung, auch den Wuchsstoffen kommt eine wichtige Rolle bei den Korrelationsverhältnissen zu. Ist es doch eine erwiesene Tatsache, dass manche Mikroorganismen gewisse Wuchsstoffe für ihr normales Gedeihen unbedingt benötigen, ja ohne sie überhaupt nicht vegetieren können, wobei sie oft nicht in der Lage sind, diese Stoffe selbst zu produzieren.

2. *Oospora lactis* — Vorkommen, systematische Stellung, Physiologie.

Ein auf Milch häufig vorkommender Organismus, der auch diesem Umstand seinen Speziesnamen verdankt, ist *Oospora lactis*. Dieser Pilz scheint die anderen milchbewohnenden Organismen stark zu beeinflussen. Ziel dieser Arbeit ist es, die wichtigsten Wuchsstoffe, die *Oospora* zu synthetisieren vermag, zu ermitteln. Wo es möglich war, wurde die absolute Wuchsstoffmenge eruiert. Da vor allem die an das Substrat abgegebenen Wuchsstoffe für das Zusammenleben mit anderen Protophyten von Bedeutung sind, wurden die Wuchsstoffe auch in den Nährlösungen, auf denen *Oospora lactis* kultiviert wurde, bestimmt.

Die Bedeutung von *Oospora lactis* für andere Milchorganismen hat u. a. S c h n e l l (1912) untersucht. S c h n e l l stellte diesbezügliche Versuche an, indem er einige Vertreter der in Milch vorkommenden Mikroorganismen symbiotisch mit *Oospora* in Milch kultivierte. Verwendet wurden ausser *Oospora*, *Bact. cyaneofluorescens*, *Bact. syncyaneum*, *Bact. lactis viscosi*, *Coccus lactis viscosi*, *Bact. linens* und Rosa-Milchhefe. Diese Mikroben wurden einzeln mit *Oospora* in Milch gezüchtet. Nach S c h n e l l wird demnach das Wachstum des *Bact. cyaneofluorescens* durch die vorbereitende Tätigkeit von *Oospora lactis* deutlich begünstigt. — *Streptococcus lactis*

vermag in Symbiose mit *Oospora* viel länger lebensfähig zu bleiben. Den von Linneboe und Hastings (1935/36) angestellten Versuchen diente ein hufeisenförmiges Rohr, das mit einer mit *Streptococcus lactis* geimpften Milch beschickt wurde. Ein Schenkel des Rohres wurde ausserdem mit *Oospora lactis* geimpft. Dieser Arm enthielt viel länger fortlebende *Streptococcus*-Keime, als der mit *Oospora* nicht geimpfte. Auch die Säurebildung und -zehrung dürfte für die Symbiose und Metabiose von grosser Wichtigkeit sein. Nach Ritter (1931) ist eine Steigerung des löslichen Stickstoffs bei Zusammenwirkung mit *Penicillium Camemberti* bemerkbar. Auch fand dieser Autor, dass durch das Säurezehrvermögen seitens *Oospora* für *Bact. linens* günstige Wachstumsbedingungen geschaffen werden.

Aber es kann auch der Fall eintreten, wo Bakterien die Milch für *Oospora* bekömmlicher machen. Ritter stellt eine Förderung des Oidiumstoffwechsels bei Gegenwart von Milchsäurebakterien fest. Dagegen wird Gärung und Wachstum der Hefe durch *Oospora lactis* stark gehemmt.

Die systematische Stellung von *Oospora lactis* ist nicht geklärt, da die Hauptfruchtform bisher noch nicht aufgefunden wurde. Daher findet sich *Oospora* im künstlichen System der *Fungi imperfecti* in der Formreihe der *Hyphomycetes*. Die Hyphomyceten zerfallen in vier Familien, von denen die der Mucedinaeaceen, zu welchen auch *Oospora lactis* gehört, dadurch gekennzeichnet ist, dass die hierher gehörenden Organismen ein farbloses oder, wenn gefärbt, dann nicht dunkles Mycel haben; die Konidienträger sind einfach; ausserdem zeigen Vertreter dieser Familie Oidienbildung. Die Oidienbildung geht so vor sich, dass das Mycel meist ruckartig in eine Reihe von ovalen, oder manchmal auch runden, bzw. mehr oder weniger eckige Teilstücke zerfällt, die dann oft zickzackartig aneinander hängen. Diese Teilstücke werden Oidien genannt. Sie können gleich wieder auskeimen und neue Individuen bilden.

Oospora lactis gelangt auf verschiedenen in der Mikrobiologie üblichen Nährböden zu guter Entwicklung. Der Milchzucker und die Stickstoffverbindungen in der Milch sind besonders geeignete Nährsubstanzen.

Auf Würzegeleatine wächst der Pilz nur an der Oberfläche, um erst später in die Gelatine einzudringen. Auf flüssigen Nährböden, wie sie z. B. in dieser Arbeit zur Anwendung kommen, bildet *Oospora lactis* eine zusammenhängende Decke, die mehr oder weniger feucht, glatt, gefaltet, gewellt u. a. m. sein kann.

Gewöhnlich wird *Oospora* auf 2%igem Würzeagar bei einer Durchschnittstemperatur von 25° C gezüchtet. Im Verlauf der Kultur von *Oospora* macht sich ein Umschlagen der Reaktion der Nährlösung bemerkbar, was mit dem Säurebildungsvermögen und Säure-

verbrauch zusammenhängt. So wird die Nährlösung durch *Oospora* zunächst stark gesäuert, um später ins Alkalische umzuschlagen. Die produzierte Säure wird also offenbar, wie Rullmann (1907) zuerst gefunden hat, später wieder aufgezehrt. Die Säureproduktion und die darauffolgende Säurezehrung verfolgte Schnell titrimetrisch und fand, dass nach 12-tägigem Wachstum die Säure stark zunimmt, um nach 27 Tagen abzunehmen. Nach 72 Tagen ist die Milch alkalisch.

Die Eiweisstoffe vermag *Oospora lactis* bis zu den Aminosäuren und sogar bis zum Ammoniak abzubauen. Auch vermag *Oospora* die Zellwände lebender Pflanzen (Kartoffelknolle etc.) zu durchbrechen. Henneberg (1904) zufolge wird abgepresste Hefe unter Auflösung der Zellmembranen durch *Oospora lactis* getötet und die Eiweisstoffe der Hefe werden bis zu Ammoniak abgebaut.

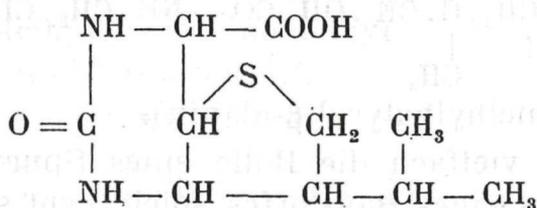
Das Fettbildungsvermögen ist, wie Geffers (1937/38) zeigte, bei verschiedenen vom Autor untersuchten *Oospora*-Stämmen in sehr weiten Grenzen schwankend. So fand Geffers bei einigen Stämmen eine Fettproduktion, die bis zu 50% des Trockengewichtes betrug, bei anderen dagegen nur 15%. Auch hinsichtlich des Fettspaltungsvermögens, der Fähigkeit, das Milcheiweiss abzubauen und der Assimilation von Lactose ergeben sich bei verschiedenen *Oospora*-Stämmen wesentliche Unterschiede. Während bei den fettreichen Stämmen die Fettspaltung eine geringe ist, das Milcheiweiss kräftig abgebaut und die Lactose assimiliert wird, weisen die fettarmen Stämme ein gegensätzliches Verhalten auf. Diese Vorgänge sind an die Anwesenheit von Enzymen gebunden, die auch von *Oospora* gebildet werden. So lassen sich eiweisabbauende und fettspaltende Enzyme nachweisen. Ebenso wird Wasserstoffsperoxyd zersetzt, was auf Katalase hindeutet. Auch Zymase wird in kleinen Mengen gebildet.

3. Die in dieser Arbeit behandelten Wuchsstoffe.

Die bei *Oospora* behandelten Wuchsstoffe sollen kurz skizziert werden.

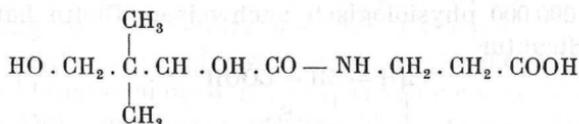
Unter Wuchsstoffen versteht man bekanntlich Stoffe, die in kleinsten Mengen schon, Zellteilung, Streckung und Dehnung der Zellwände hervorrufen. Als Nährstoffe kommen sie wegen ihrer geringen Menge nicht in Betracht. Zunächst wollen wir uns den als Hefewuchsstoffen bekannten zuwenden. Es hat sich gezeigt, dass Hefe, in kleiner Menge in synthetische Nährlösung gebracht, nicht zu wachsen vermag. Wird sie aber in grösserer Menge verimpft, so verläuft das Wachstum normal. Aus diesen Versuchen erkannte E. Wildiers (1901), dass mit der grösseren Hefemenge in die synthetische Nährlösung ein Stoff eingeführt wurde, der das Wachs-

tum des Hefepilzes ermöglicht, und nannte diesen Wirkstoff Bios. Der thermostabile Stoff erwies sich als nicht einheitlich und es gelang die Zerlegung. Zunächst wurden zwei Fraktionen, Bios I und Bios II, gewonnen. Bios I wurde mit meso-Inosit identifiziert. Weitere Forschungen ergaben, dass auch Bios II kein einheitlicher Stoff ist. So konnte Lash Miller (1932) durch Behandeln mit Tierkohle Bios II in zwei Fraktionen zerlegen, von denen die eine, Bios II B, adsorbiert wird; die nicht adsorbierte Fraktion ist Bios II A. Bios II B (Vitamin H, Coenzym R, Hautfaktor) wurde von Kögl (1936) aus getrocknetem chinesischem Enteneigelb kristallisiert erhalten und Biotin genannt. Diese Fraktion stellt einen der wirksamsten Stoffe dar, und lässt sich noch in einer Verdünnung von 1 : 400 000 000 000 physiologisch nachweisen. Biotin hat nach Kögl folgende Struktur



Biossubstanzen sind im Pflanzenreich sehr verbreitet, obwohl sie nicht gleichmässig in allen Organen verteilt sind. Wir finden Biotin besonders reichlich im Kambium, was ja durchaus verständlich erscheint. Weiter sind Scutellum und Endosperm mancher Pflanzen biosreich. Gewisse Pilze haben die Fähigkeit verloren, Bios selbst zu bilden, und sind auf die Zufuhr von aussen angewiesen, ein Umstand, der die Bedeutung dieser Stoffe viel leichter erkennen liess. Ferner bedürfen seiner, ausser Lactoflavin, zum Wachstum und Farbstoffbildung Milchsäurebakterien, Propionsäurebakterien und Tetrakokken. Wie die von Nielsen und Johansen (1941) durchgeführten Untersuchungen zur Klärung der Stickstoffassimilation durch verschiedene *B. radicola*-Stämme zeigen, werden auch diese Organismen durch Biotin wesentlich gefördert. Schon die Konzentration von $1/3 \cdot 10^{12}$ zeigt eine deutliche Wirkung, $1/30 \cdot 10^9$ wirkt optimal und höhere Gaben hemmen bereits das Wachstum. — Die wichtigsten Eigenschaften des Biotins sind seine Wasserlöslichkeit, Hitzebeständigkeit, sowie Alkali- und Säurefestigkeit, schliesslich Adsorbierbarkeit an Kohle sowie Fällbarkeit mit Phosphor-Wolframsäure. Mit Presshefe lässt sich Biotin aus Würze ausschütteln. Die physiologisch interessante Tatsache, dass Biotinmethylester auf Hefe ebenso wirkt wie Biotin, dürfte nach Kögl auf die leichte enzymatische Verseifung des Esters zurückzuführen sein. Weiter soll noch erwähnt werden, dass die Wirkung des Biotins durch Eiweisstoffe aufgehoben werden kann. Die alkoholische Gärung wird durch Biotin nicht beeinflusst.

Von grossem Interesse ist ferner das β -Alanin, dem offenbar im Zellstoffwechsel eine grosse Bedeutung zukommt. Die Hydrolyse des Carnosins (β -Alanyl-histidins) und auch des Anserins (β -Alanyl-methylhistidins) liefert β -Alanin. Dieses kann auch in Nährlösungen für *Corynebacterium diphtheriae* durch l-Carnosin ersetzt werden, indem letzteres wahrscheinlich enzymatisch gespalten wird. Durch Decarboxylierung der Asparaginsäure entsteht ebenfalls β -Alanin und möglicherweise ist das Asparaginyln-histidin die Vorstufe des β -Alanyl-histidins. Auch das Serin (α -Amino- β -oxypropionsäure) ist ein β -Alaninderivat und desgleichen ist diese Aminosäure Baustein der weitverbreiteten und als Wuchsstoff bedeutsamen Panthothensäure



(α , γ -Dioxy- β , β -dimethylbutyryl- β -alanin).

Dass β -Alanin vielfach die Rolle eines Spurenbaustoffes oder Wuchsstoffes, nicht eines Baustoffes spielt, geht schon daraus hervor, dass es bereits in Konzentrationen von $1/14 \cdot 10^6$ auf manche Hefen maximale Wirkung entfaltet (Nielsen und Hartelius 1938), ferner auch deshalb, weil β -Aminosäuren von Mikroorganismen, mit wenigen Ausnahmen, als Stickstoffquelle kaum oder überhaupt nicht in Betracht kommen (vgl. jedoch Nielsen 1940). — β -Alanin ist wesensgleich mit Bios II A nach Miller (Bios III nach Kögl), jener Fraktion, die von Kohle nicht adsorbiert wird. Auf *obergärige Hefe* (*Saccharomyces cerevisiac*) entfaltet β -Alanin nur dann seine Wirksamkeit, wenn Asparagin oder Asparaginsäure zugegen ist, mit welchen Stoffen es offenbar eine anhydrische Bindung eingeht. Ohne diese Stoffe ist Hemmung oder Giftwirkung zu beobachten. Allerdings muss die freie Aminosäure geboten werden. β -Alanyl-glycin ist unwirksam. Ferner sind Biotin und Aneurin als Co-Wuchsstoffe notwendig (Nielsen und Hartelius 1939). — Bei *Nematospora gossypii* zeigt β -Alanin ebenfalls einen deutlichen Wachstumseffekt, wirkt hingegen auf *Aspergillus niger* hemmend. Wie Nielsen und Hartelius (1941) zeigten, kann das β -Alanin ebenso wie das Biotin mit Presshefe aus Würze ausgeschüttelt werden.

Ein weiterer wachstumsfördernder Faktor ist der *Aspergillus*-faktor B_2 aus der Gruppe der B-Wuchsstoffe nach Nielsen. Diese Phytoergone unterscheiden sich von den Streckungswuchsstoffen der Gruppe A vor allem durch die Ätherunlöslichkeit und durch die Wachstumsförderung von *Aspergillus* und anderer Pilze. B_2 kommt meist mit der Biosgruppe (B_1) gemeinsam vor und

hydratstoffwechsel der Mikroorganismen einzugreifen. In diesem Zusammenhang sei kurz erwähnt, dass das Vitamin B₁ mit Pyrophosphorsäure verestert, die Aneurinpyrophosphorsäure, als Cocarboxylase bei der Spaltung der Brenztraubensäure in Azetaldehyd und Kohlensäure durch Hefe wirkt.

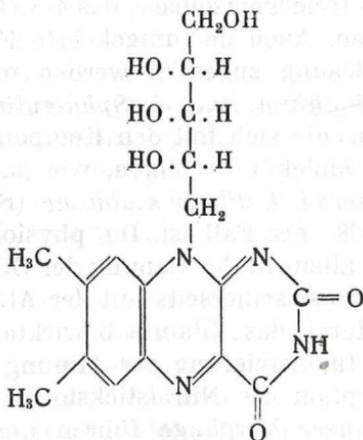
Als Wuchsstoff spielt das Aneurin eine hervorragende Rolle. Aber auch als Co-Wuchsstoff kann es von Bedeutung sein. So hat Kögl (1937) gezeigt, dass das Thiamin allein auf *Nematospora gossypii* unwirksam ist, aber die Wirkung von Biotin und Mesoinosit erhöht. Ferner benötigt *Lophodermium* das Thiamin zum Wachstum, allerdings muss auch Biotin zugegen sein.

Schliesslich sei erwähnt, dass die *Heferasse M* kaum eine Förderung erfährt und *Apergillus niger* schon durch 0,1 γ pro 20 ccm gehemmt wird (Janke A. und F. Sorgo 1939).

Das Lactoflavin (Vitamin B₂, Riboflavin) fördert bei *Aspergillus niger* das Wachstum, ebenso die Aufnahme von Nitraten an Stelle von Ammoniumstickstoff. Auch die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (*Lactobacillus casei*) benötigen diesen Farbstoff. In Verbindung mit Phosphorsäure bildet das Lactoflavin die prosthetische Gruppe des gelben Atmungsfermentes, welches als wasserstoffaktivierendes Enzym für fakultative Anaerobier wichtig ist. In diesem Zusammenhang ist die Bedeutung des Lactoflavins für die Stoffwechselfunktionen des Eisens erwähnenswert.

Weiters greift das Vitamin gemeinsam mit anderen Enzymen in den Eiweiss- und Kohlehydratabbau ein.

Das gelbe, grün fluoreszierende, lichtempfindliche Vitamin ist in der Milch entdeckt worden und verdankt seinen Namen einer Gruppe von Farbstoffen, den Flavinen. Dem Lactoflavin kommt folgende Struktur zu:



(6, 7-Dimethyl-isoalloxazin-ribose).

Die ebenfalls zur Gruppe der B-Vitamine gehörende Nicotinsäure (P.P.-Faktor) wurde zuerst aus Leber isoliert und erwies sich wirksam auf das Wachstum der Diphtheriebakterien. Sie ist eine kristallisierende, farblose, in Wasser lösliche Substanz und stellt eine Pyridin-3-karbonsäure dar. Als Bestandteil der Co-Dehydrasen (v. Euler, Myrbäck u. Mitarbeiter 1930, 1931, Warburg und Christian 1935, 1936), wirkt sie im Kohlehydratstoffwechsel mit, indem sie die Wasserstoffübertragung an einen Zwischenakzeptor vermittelt. Physiologisch von Bedeutung ist, dass das Nicotylamid und die Nicotinsäure durch Tetra- und Hexahydronicotinsäure ersetzt werden kann. Nicotylglycin wirkt auf *Staphylococcus aureus* ebenso wie Nicotinsäure. Wie Kögl (1937) zeigte, wird die Wachstumsförderung der Nicotinsäure durch Thiamin und Biotin verstärkt.

4. Arbeitsgang.

Um den Wuchsstoffgehalt bei drei Stämmen von *Oospora lactis* zu bestimmen, werden sie zunächst auf genau definierter synthetischer Nährlösung gezogen. Alle drei Stämme werden in je 20 Rouxkolben gezüchtet. Die Nährlösungsmenge beträgt für jede Flasche 50 ccm. Für *Oospora lactis* B hat die Nährlösung folgende Zusammensetzung:

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	m/16	7.199	g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	m/32	4.12	g
KH_2PO_4	m/64	2.127	g
$\text{Fe Cl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	m/65536	0.00414	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	m/256	0.96	g
Glucose	m/2	90.07	g
doppelt dest. Wasser		1000.0	ccm

Die Salze werden in Lösung von der Glucose getrennt sterilisiert, indem sie bis zu 120°C erhitzt und allmählich abgekühlt werden. Während der Kultur ist ein starkes Gelbwerden der Nährlösung zu beobachten. Anfangs hat die Nährlösung ein pH von 5,21, nachher 2,55.

Für *Oospora lactis* A und C wird folgende Nährlösung gewählt (Janke):

I.	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	m/32	20.62	g
	KH_2PO_4	m/16	8.5	g
	H_3PO_4	m/32	3.06	g
			(= 15.3 g 20% Ph. Sre)	
II.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	m/256	0.96	g
	$\text{Fe Cl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	m/32768	0.00828	g
	Glucose	m/2	90.07	g

Sowohl I als auch II wird in doppelt dest. Wasser gelöst und jedes auf 1 Liter aufgefüllt. Im sterilen Zustand werden dann die beiden Lösungen zu gleichen Teilen vermischt. Das Anfangs-pH beträgt 6,75.

Oospora lactis A hat in Kultur auf Minerallösung ein trockenes, papierähnliches Aussehen. Die Nährlösung zeigt am Ende der Kultur pH 2,59, bei 0.1. C 2,95. In beiden Fällen wird die Lösung zitronengelb verfärbt.

Nach 10-tägiger Kulturdauer wird das Myzel abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Trockengewichte betragen: 0.1.A 7,11 g; 0.1.B. 6,55 g; 0.1.C 5.80 g. Die Nährlösungen werden ebenfalls im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Die getrockneten Mycelien und Nährlösungen werden getrennt folgender, von Janke (Janke u. Sorgo 1939) ausgearbeiteter Zerlegung in die einzelnen Wuchstofffraktionen unterworfen.

Zunächst wird im Soxhletapparat dreimal mit je 50 ccm Äther extrahiert. In die Lösung geht das allenfalls vorhandene Heteroauxin über, welches nicht weiter untersucht werden soll. Sodann folgt eine dreimalige Extraktion, ebenfalls im Soxhlet, mit je 50 ccm Chloroform. Dadurch geht der Wuchsstoff MP in Lösung und wird mit *Phycomyces Blakesleeanus* (+) ausgetestet. Der Rückstand nach der Chloroformextraktion wird im Sintertiegel 1G3 in ein Becherglas mit 50 ccm doppelt destilliertem Wasser gestellt und das Ganze auf dem Wasserbade zwei Stunden lang erhitzt. Die so gewonnene Lösung wird mit Aceton versetzt und der gebildete Niederschlag in der Elektrozentrifuge ausgeschleudert. Die klare Lösung, mit 6 Teilen Alkohol versetzt, wird eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und einer weiteren Fällung mit einer ammoniakalischen Bleiacetatlösung, welche so hergestellt wird, dass zu 100 ccm gesättigter Bleiacetatlösung 10 ccm Ammoniak hinzugefügt werden, unterworfen. Hiedurch wird das Lactoflavin, die eventuell vorhandene Ascorbinsäure und der Mesoinosit gefällt. Die so erhaltene Fällung und Lösung werden mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit. Die aus der entbleiten Fällung erhaltene Lösung wird bis zu 10 ccm eingedampft und der Lactoflavingehalt stufenphotometrisch ermittelt. — Die Lösung nach der Bleiacetatfällung wird, nachdem das Blei entfernt ist, eingedampft, vom Schwefelwasserstoff befreit und mit Medizinalkohle Merck versetzt. Nach 12-stündiger Adsorption wird die Kohle abfiltriert. Die Lösung enthält die Wuchsstoffe Bios 11 A, Nielsen B₂ und den Wuchsstoff MR nach Schopfer. Diese drei Wuchsstoffe werden mit *Saccharomyces cerevisiae* Stamm 55, *Aspergillus niger* Stamm Wehmer und *Rhizopus Cohnii* ausgetestet. Die Kohle wird zunächst mit Wasser und Alkohol gewaschen und schliesslich wird mit einem Gemisch von Aceton und Ammoniak eluiert. Dieses Aceton-Ammoniak-Gemisch wird so hergestellt, dass zu 375 ccm dest. Wasser 25 ccm Ammoniak zugegeben und diese Lösung mit Aceton auf 1000 ccm aufgefüllt wird. Nach erfolgtem Eindampfen im Vakuum, wird der Rückstand in 5%iger Schwefel-

säure gelöst und mit 50%iger, in 5%iger Schwefelsäure gelöster Phosphorwolframsäure gefällt. In Lösung bleiben die Nicotinsäure und die etwa vorhandene Pantothersäure. Der Niederschlag wird mit Salzsäure gewaschen und im zerriebenen Zustand mit überschüssiger Bariumhydroxydlösung versetzt. Das gebildete Bariumwolframat wird abfiltriert und der Überschuss an Bariumionen in der Lösung wird mit Schwefelsäure als Bariumsulfat gefällt. Nun wird versucht, aus dieser Lösung das Biotin vom Thiamin zu trennen. Dies geschieht hier durch Fällen mit Bleiacetat bei pH 6,8, wobei das Thiamin gefällt, das Biotin aber im Filtrat bleiben soll. Wie sich durch die Testversuche erweist, ist dieser Weg zur Trennung des Biotins vom Thiamin nicht gangbar. Die nach diesem Arbeitsgang erhaltenen Fraktionen werden in 20 ccm Wasser gelöst und mit Natronlauge auf pH 5 eingestellt, sodann in Ampullen zu je 5 ccm abgefüllt, zur Vertreibung der Luft etwas erhitzt und eingeschmolzen. Nach dreimaligem Sterilisieren im strömenden Dampf zu je 20 Minuten, werden die Ampullen bis zur jeweilig erfolgten Austestung im Kühlschrank aufbewahrt.

Bei den Wuchsstoffen MR nach Schopfer und Nielsen B_2 wird der Nielsenfaktor f angegeben. Dieser Faktor f ist der Quotient aus dem mit Wuchsstoffzusatz und dem ohne Wuchsstoffzusatz ermittelten Trockensubstanzgewicht.

5. Der Phycomyces-Test nach Schopfer.

Nachdem die erste Fraktion den Faktor MP-Schopfer enthält und dieser genau so wie das Thiamin ausgetestet werden soll, folgt zunächst die Thiaminauswertung.

Bedeutungsvoll für die Ausarbeitung der Bestimmungsmethode für Thiamin waren vor allem die Beobachtungen Schopfer's (1935) und Burgeff's (1934), dass Thiamin für *Phycomyces Blakesleanus* und andere Mucorineen in synthetischer Nährlösung unbedingt notwendig ist. Aber auch eine ganze Reihe anderer Pilze wurde auf ihr Verhalten gegenüber Aneurin geprüft. Bei mehreren wurde eine mehr oder weniger starke Förderung festgestellt. So fanden Kögl F. und Niels Fries (1937), dass z. B. der Oomycet *Phytophthora cactorum* in synthetischer Nährlösung bei Thiamin-anwesenheit gut wächst. *Nectria coccinea*, ein an sich im mineralischen Milieu gut wachsender Ascomycet, durch Vitamin B_1 gefördert wird. Auch der Obstbaumparasit *Sclerotinia cinerea*, von J. J. Wilman (1920) bereits auf mineralischen Nährboden gezogen, zeigt besseres Wachstum bei Aneurin-Anwesenheit. Sehr stark fördernd wirkt das Vitamin auf den in morschem Holz lebenden Ascomyceten *Helvella infula*. — Gefördert wird auch *Tricholoma nudum*. Nur

geringen Wachstumseffekt zeigt aber das Thiamin bei *Rhizopus suinus* (Janke Alexander und Fritz Sorgo 1939).

Es erhebt sich nun die Frage, in welchen Konzentrationen das Thiamin bereits wirkt und welche Mengen mittels der mikrobiologischen Testmethoden erfassbar sind. — Zahlreiche Versuche klärten dies. Beim Testorganismus *Phycomyces* zeigen 0,01—0,001 γ in 25 ccm Nährlösung bereits deutliche Wirkung. Kögl und Niels Fries (1937) fanden, dass *Polyporus adustus* bereits auf 0,0001 γ pro 25 ccm Nährlösung anspricht. Dies kommt einer Verdünnung 1 : 250 000 000 000 gleich. Ähnliches zeigt auch *Polyporus abietinus*. Andere Polyporaceen, wie *Trametes*-Arten, *Fomes pinicola* und *Lenzites sepiaria*, werden weit weniger gefördert. — Schopfer, dem wir die mikrobiologische Thiaminbestimmung verdanken, verwendete *Phycomyces Blakesleanus*. Das Optimum für diesen Pilz liegt bei etwa 0,25—0,5 γ (Thren 1941).

Die Bestimmungsmethode (Schopfer und Jung 1937, 1938) geht davon aus, dass, wie eingangs erwähnt, *Phycomyces*, obwohl auf Thiamin angewiesen, selbst diesen Wuchsstoff nicht zu bilden vermag. Werden nun gestaffelte Vitaminmengen zu einer thiaminfreien Nährlösung zugegeben, so erreichen die Trockengewichte des Pilzes für jede Wuchsstoffmenge eine bestimmte Grösse. Da diese Trockengewichte in nur geringen Grenzen schwanken (Thren 1941), ist man in der Lage, aus dem Pilztrockengewicht auf den Thiamingehalt der Nährlösung zu schliessen. Mit dem *Phycomyces*-Test sind praktisch 0,01 γ Thiamin gut erfassbar.

Die Testmethode ist, wie Schopfer, Robbins und Kavanagh zeigten, für Aneurin spezifisch. Weiter hat sich gezeigt, dass die physiologische Wirksamkeit in erster Line an die Aminogruppe und die monosubstituierte 5-Methylgruppe im Pyrimidinanteil gebunden ist, im Thiazol an das H-Atom in 2-Stellung, und die Hydroxyäthyl-Gruppe in 5-Stellung. Auch das Hydroxyl in der Hydroxyäthylgruppe ist nicht ersetzbar.

Interessant sind die Ergebnisse, zu denen Bonner und Buchmann gelangten. Die Forscher fanden, dass das Thiazol vor allem benötigt wird, aber ohne Pyrimidin kann der Thiazolabbau nicht erfolgen. Das Mengenverhältnis Pyrimidin : Thiazol wird in einem besonderen Fall mit 1 : 10 angegeben.

Zum Test wird auf Würzeagar gezüchteter *Phycomyces Blakesleanus* (+) verwendet. Der Nährlösung werden pro 10 ccm 1 Million Sporen zugesetzt.

Die Nährlösung, welche beim Test verwendet wird, hat folgende Zusammensetzung (Thren 1941):

Glukose	50,0 g
Asparagin	1,0 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Monokaliumphosphat	1,5 g
doppelt dest. Wasser	1000 ccm

Sterilisiert wird 30 Minuten bei 110° C, die Glukose getrennt. Der pH-Wert der Nährlösung beträgt 4,2—4,3.

In Anbetracht der geringen Stickstoffmenge der Nährlösung (0,1% Asparagin), erhebt sich die Frage, ob der mit der zu prüfenden Substanz zugeführte Stickstoff nicht etwa Mehrerträge hervorruft, die auf die Thiaminwirkung zurückgeführt werden könnten. Und dies umso mehr, als Schopfer (1937) zeigen konnte, dass viele Aminosäuren sehr gute N-Quellen für *Phycomyces* darstellen. In weiterer Folge haben sich auch zahlreiche andere organische Stickstoffverbindungen, im Gegensatz zu anorganischen, als gute N-Quellen erwiesen. Thren hat nun den Versuchserien nicht nur verschiedene Thiaminmengen, sondern auch den Stickstoff gestaffelt zugesetzt. Das Ergebnis war folgendes: Bei Vitamingehalten von 0,01 bis 0,1 γ ist die Beeinflussung des N-Gehaltes des Extraktes nur gering. Wird aber mit Extraktkonzentrationen von 10—1% gearbeitet, bei relativ geringen Vitaminmengen, dann können nur die Pilzernten unter 40,0 mg verwertet werden.

Die Eichkurve wird mit synthetischem Thiamin ausgeführt. Als Kulturgefäße dienen Jenaer Glaskappenflaschen, welche mit je 20 ccm der geimpften und mit gestaffelten Vitaminzusätzen versehenen Nährlösung beschickt werden. Nach 10-tägiger Kulturdauer bei 26° C, wird das Myzel abfiltriert (Glassintertiegel 1 G 3), mit je 50 ccm heissem Wasser gewaschen und, nach erreichter Gewichtskonstanz, gewogen.

Das nach der Kohleadsorption mit Aceton und Ammoniak eluierte Thiamin wird mit Phosphor-Wolframsäure quantitativ gefällt und ausgetestet. Hierbei wird ähnlich wie bei der Aufnahme der Eichkurve verfahren, nur werden, anstatt des synthetischen Vitamins, gestaffelte Mengen (in Vol.%) des Extraktes zugesetzt.

Es werden die aus dem Myzel und der Nährlösung gewonnenen Extrakte getrennt auf den Thiamingehalt geprüft.

Bei jeder Versuchsreihe wird auch die Kontrollreihe mit Zusätzen von synthetischem Vitamin, ohne Extrakt, aufgestellt. Wenn bei einer Versuchsreihe die Kontrollreihe mit der Eichkurve nicht übereinstimmende Werte ergibt, wird die ganze Versuchsreihe verworfen.

Um zu prüfen, ob die Trennung des Thiamins vom Biotin durchführbar ist, wird auch die Biotinfraktion mit *Phycomyces* ausgetestet.

Tabelle 1a.

Bestimmung
des Thiamingehaltes der Thiaminfraktion.
Extrakt aus dem Myzel.

	Zusatz pro 20 ccm	mg Trockengewicht				Mittelwert
		I	II	III	IV	
<i>Oospora lactis</i> A	1,5 Vol. % Extrakt	0	0	0	0	0
	3,0 " " "	0,5	0	0	0	0,1
	6,0 " " "	2,0	0,5	1,5	1,0	1,5
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,5	2,0			
	0,05 " "	11,5	13,0			
<i>Oospora lactis</i> B	1,5 Vol. % Extrakt	0	0	0	0	0
	3,0 " " "	0	0	0	0	0
	6,0 " " "	0,5	1,0	1,0	0,5	0,8
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,0	1,5			
	0,05 " "	11,0	10,0			
<i>Oospora lactis</i> C	1,5 Vol. % Extrakt	0,5	0	0,5	0	0,3
	3,0 " " "	1,0	0,5	1,5	0,5	0,9
	6,0 " " "	3,5	2,0	4,0	3,0	3,1
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	3,0	2,5			
	0,05 " "	13,5	14,0			

Tabelle 1b.

Bestimmung
des Thiamingehaltes der Thiaminfraktion.
Extrakt aus der Nährlösung.

	Zusatz pro 20 ccm	mg Trockengewicht				Mittelwert
		I	II	III	IV	
<i>Oospora lactis</i> A	1,5 Vol. % Extrakt	0,5	0	0	0,5	0,3
	3,0 " " "	3,0	2,5	1,5	2,5	2,4
	6,0 " " "	6,0	9,0	7,5	8,0	8,8
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	1,5	2,5			
	0,05 " "	12,0	12,5			—
<i>Oospora lactis</i> B	1,5 Vol. % Extrakt	2,0	3,5	2,5	2,0	2,5
	3,0 " " "	6,5	9,5	6,0	7,5	7,4
	6,0 " " "	10,0	12,5	11,0	10,5	11,0
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,5	3,5			
	0,05 " "	13,5	14,0			
<i>Oospora lactis</i> C	1,5 Vol. % Extrakt	0	0	0	0	0
	3,0 " " "	0	0	0	0	0
	6,0 " " "	0,5	0,5	1,5	0,5	0,8
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	3,0	1,5			
	0,05 " "	13,5	11,0			

Tabelle 2a.

Bestimmung
des Thiamingehaltes in der Biotinfraktion.
Extrakt aus dem Myzel.

	Zusatz pro 20 ccm	mg Trockengewicht				Mittelwert
		I	II	III	IV	
<i>Oospora lactis</i> A	1,5 Vol. % Extrakt	5,5	6,0	7,0	6,0	6,1
	3,0 " " "	14,0	14,5	13,5	14,0	14,0
	6,0 " " "	40,0	38,5	42,0	38,0	39,6
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,5	3,5			
	0,05 " " "	13,5	12,5			
<i>Oospora lactis</i> B	1,5 Vol. % Extrakt	1,0	0	1,5	0,5	0,8
	3,0 " " "	3,5	2,5	4,5	3,0	3,4
	6,0 " " "	6,5	8,0	9,0	8,0	7,9
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,5	3,0			
	0,05 " " "	12,5	11,5			
<i>Oospora lactis</i> C	1,5 Vol. % Extrakt	0	0	0	0	0
	3,0 " " "	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	6,0 " " "	1,5	1,0	1,0	1,5	1,3
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	1,5	2,5			
	0,05 " " "	12,5	11,5			

Tabelle 2b.

Bestimmung
des Thiamingehaltes in der Biotinfraktion.
Extrakt aus der Nährlösung.

	Zusatz pro 20 ccm	mg Trockengewicht				Mittelwert
		I	II	III	IV	
<i>Oospora lactis</i> A	1,5 Vol. % Extrakt	2,5	3,5	2,0	2,5	2,6
	3,0 " " "	7,0	6,5	6,5	7,0	6,8
	6,0 " " "	10,0	12,5	10,5	11,5	11,1
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	3,5	4,0			
	0,05 " " "	15,0	13,0			
<i>Oospora lactis</i> B	1,5 Vol. % Extrakt	0	0	0	0	0
	3,0 " " "	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	6,0 " " "	2,0	1,5	2,5	2,0	2,0
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,0	2,5			
	0,05 " " "	11,5	12,5			
<i>Oospora lactis</i> C	1,5 Vol. % Extrakt	0	0	0	0	0
	3,0 " " "	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	6,0 " " "	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,5	2,0			
	0,05 " " "	12,0	10,0			

Die mit gestaffelten Wuchsstoffzusätzen durchgeführten Versuche zeigen eine gute Übereinstimmung. Beim Vergleich der Fraktionen aller drei *Oospora*-Stämme und deren Nährlösungen zeigt sich Folgendes:

Tabelle 3.

Thiaming Gesamtmenge.

a) Thiaminfraktion.

<i>Oospora</i>	Wuchsstoffzusatz in Vol.%	Trockengewicht (Mittelwert) mg	γ Thiaminmenge nach der Eichkurve	γ Thiamin in der gesamten Fraktion
A Myzel	6	1,5	0,01	0,16
A Nährlösung	6	8,8	0,03	0,5
B Myzel	6	0,8	0,01	0,16
B Nährlösung	6	11,0	0,04	0,68
C Myzel	6	3,1	0,02	0,32
C Nährlösung	6	0,8	0,01	0,16

b) Biotinfraktion.

<i>Oospora</i>	Wuchsstoffzusatz in Vol.%	Trockengewicht (Mittelwert) mg	γ Thiaminmenge nach der Eichkurve	γ Thiamin in der gesamten Fraktion
A Myzel	6	39,6	0,1	1,6
A Nährlösung	6	11,1	0,04	0,68
B Myzel	6	7,9	0,03	0,5
B Nährlösung	6	2,0	0,01	0,16
C Myzel	6	1,3	0,01	0,16
C Nährlösung	6	1,0	0,01	0,16

Die Gesamtmenge an Thiamin ist demnach für die einzelnen Stämme folgende:

Tabelle 4.

Gesamtthiamingehalt beider Fraktionen.

<i>Oospora lactis</i>	γ Thiamingehalt	γ Gesamtthiamingehalt aus Myzel und Nährlösung
A Myzel	1,76	2,94
A Nährlösung	1,18	
B Myzel	0,66	1,5
B Nährlösung	0,84	
C Myzel	0,48	0,8
C Nährlösung	0,32	

Der Thiamingehalt pro 10 g Myzeltrockengewicht beträgt demnach O. l. A 4,3 γ , O. l. B 2,4 γ , O. l. C 1,3 γ .

Diesen Untersuchungen zufolge ist also *Oospora lactis* A am thiaminreichsten, während *Oospora lactis* B und C weniger Thiamin produzieren. Der Thiamingehalt nimmt mit zunehmendem Fettgehalt ab. Das Thiamin ist nicht nur auf die „Thiaminfraktion“ beschränkt, sondern wird auch in der „Biotinfraktion“ gefunden. Ferner wird es annähernd zur Hälfte an das Substrat abgegeben. Demnach ver-

hält sich *Oospora lactis* anders als z. B. *Bac. vulgatus* (Scheunert und Schieblich 1923), welches das Vitamin an die Nährlösung nicht abgibt.

6. Der Wuchsstoff MP.

Der Wuchsstoff MP, zu dem offenbar auch der auf *Mucor Ramannianus* wirksame Faktor (Müller 1937) und der von Dagsys (1937) aus Getreidekeimlingen (Guttenberg 1935) gewonnene, auf *Aspergillus niger* wirksame Wuchsstoff zu rechnen ist, ist in Wasser und Alkohol löslich, in Äther unlöslich und hat ferner mit dem Thiamin die Adsorbierbarkeit an Kohle gemein. Abgesehen von der Chloroformlöslichkeit und Alkalibeständigkeit, Eigenschaften die dem Aneurin fehlen, stimmt der Wuchsstoff vor allem auch in seiner Wirkung auf *Phycomyces* mit dem Vitamin B₁ überein und besteht zufolge Janke und Sorgo (1939) wahrscheinlich aus den Komponenten des Aneurins. Daher wird die den Wuchsstoff MP enthaltende Fraktion auf *Phycomyces Blakesleeanus* (+) ausgetestet. Als Nährlösung wird dieselbe wie beim Thiamintest verwendet, auch das Sterilisieren geschieht bei 120° C während 30 Minuten, wobei die Glukose wieder getrennt sterilisiert wird. Als Kulturgefäße dienen ebenfalls Glaskappenflaschen. Die Versuchsanordnung sowie die Angaben über die Menge stimmen mit denen beim Thiamintest überein. Bei jeder Versuchsreihe wird auch immer, ähnlich wie es beim Thiamintest der Fall ist, eine Kontrollreihe angesetzt. Die gefundenen Werte sind in folgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 5a.
Austestung des Wuchsstoffes MP.
Extrakt aus dem Myzel.

	Zusatz pro 20 ccm	mg Trockengewicht				Mittelwert
		I	II	III	IV	
<i>Oospora lactis A</i>	1,5 Vol. % Extrakt	0,5	1,0	0,5	0,5	0,6
	3,0 " " "	2,0	1,5	1,5	1,0	1,5
	6,0 " " "	3,5	2,0	2,5	1,5	2,4
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,5	3,5			
	0,05 " "	13,0	11,0			
<i>Oospora lactis B</i>	1,5 Vol. % Extrakt	0,5	0	0,5	1,0	0,5
	3,0 " " "	2,5	2,0	3,0	1,0	2,1
	6,0 " " "	5,0	6,5	7,0	6,0	6,1
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,0	2,5			
	0,05 " "	12,0	14,0			
<i>Oospora lactis C</i>	1,5 Vol. % Extrakt	0	0	0	0	0
	3,0 " " "	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	6,0 " " "	1,0	2,5	2,0	2,0	1,9
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	1,5	2,5			
	0,05 " "	11,0	12,0			

Tabelle 5b.

Austestung des Wuchsstoffes MP.
Extrakt aus der Nährlösung.

	Zusatz pro 20 ccm	mg Trockengewicht				Mittelwert
		I	II	III	IV	
<i>Oospora lactis A</i>	1,5 Vol. % Extrakt	2,5	1,0	1,5	1,0	1,5
	3,0 " " "	4,0	3,5	3,0	4,5	3,7
	6,0 " " "	7,5	10,0	8,5	8,0	8,5
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	3,0	3,5			
	0,05 " "	11,0	13,5			
<i>Oospora lactis B</i>	1,5 Vol. % Extrakt	0,5	0	0,5	1,0	0,5
	3,0 " " "	1,0	3,0	3,5	2,0	2,4
	6,0 " " "	6,5	5,5	7,5	8,0	6,9
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,5	3,5			
	0,05 " "	14,5	12,5			
<i>Oospora lactis C</i>	1,5 Vol. % Extrakt	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	3,0 " " "	2,5	1,0	1,5	1,0	1,5
	6,0 " " "	5,0	7,5	6,0	5,5	6,0
Kontrolle	0,01 γ Thiamin	2,5	3,5			
	0,05 " "	14,0	12,0			

Bei der Zusammenstellung der Ergebnisse der Austestung der MP-Fraktion auf *Phycomyces Blakesleeanus* (+) ergibt sich folgendes:

Tabelle 6.

<i>Oospora</i>	Wuchsstoff-zusatz	Trockengewicht Mittelwert mg	Gesamtgewicht aus Myzel und Nährlösung
A Myzel	6 Vol. %	2,38	10,88 mg
A Nährlösung	6 "	8,5	
B Myzel	6 "	6,12	12,99 mg
B Nährlösung	6 "	6,87	
C Myzel	6 "	1,87	7,87 mg
C Nährlösung	6 "	6,0	
Bezogen auf 10 g Trockenmyzel		: O. l. A 15,5 mg, O. l. B 18,2 mg. O. l. C 13,1 g.	

Daraus folgt, dass die höchsten Wuchsstoffmengen *Oospora lactis B* erzeugt. Die kleinste Wuchsstoff-Produktion hat *Oospora lactis C*. Ausserdem zeigt sich, dass die Nährlösungen stets wuchsstoffreicher sind als die Myzelien. Die Gegenüberstellung mit der Thiamin-Biotinfraktion zeigt, dass zwar der Stamm C ebenfalls der thiaminärmste ist, doch ist das Vitamin immer weit gleichmässiger auf Myzel und Nährlösung verteilt. Ferner ist der Stamm A der thiaminreichste.

7. Das Lactoflavin.

Von den Bestimmungsmethoden kann sowohl die photometrische Messung der spezifischen Lichtabsorption und der Fluoreszenz als auch der Wachstumstest mit *Lactobacillus casei* Verwendung finden. Auch fördert das Vitamin B₂ das Wachstum verschiedener Eumyceten, wie *Phycomyces Blakesleeanus*, *Mucor mucedo* (—), *M. hiemalis* (+), *Absidia repens* und *A. orchidis* (+) (Schopfer 1934, 1934 a), mit deren Hilfe eine quantitative Erfassung des Wachstoffs denkbar wäre. Aus methodischen Gründen wird indessen bei der Lactoflavinbestimmung zur Messung der Intensität der gelben Farbe gegriffen. Dabei wird das Pulfrichphotometer unter Verwendung des Filters S 47 benutzt. Die Schichtdicke ist 3 cm. Tabelle 7 gibt die zur Eichkurve verwendeten Werte wieder. Die Bestimmung wird wegen der Lichtempfindlichkeit des Lactoflavins im verdunkelten Raume ausgeführt.

Tabelle 7.

Lactoflavinkurve.

Vitamin B ₂	Durchlässigkeitswert	Extinktion	Extinktionskoeffizient
5 γ /ccm	26	0,585	0,195
2 „	55	0,260	0,087
1 „	80	0,097	0,032
0,5 „	92	0,036	0,012

Die Messung der Extrakte ergibt folgende Werte:

Tabelle 8.

Bestimmung des Vitamin B₂-Gehalts mittels des Pulfrichphotometers.

<i>Oospora</i>	Extinktion	Extinktionskoeffizient	B ₂ -Gehalt	Gesamtgehalt aus Myzel und Nährlösung
A Myzel	0,260	0,087	2,3 γ	3,1 γ
A Nährlösung	0,081	0,027	0,8 „	
B Myzel	0,097	0,032	1,0 „	2,6 γ
B Nährlösung	0,125	0,042	1,6 „	
C Myzel	0,046	0,015	0,5 „	4,9 γ
C Nährlösung	0,509	0,170	4,4 „	

Myzel vom Trockengewicht 10 g würde demnach an Lactoflavin synthetisieren: O. I. A 4,4 γ , O. I. B 3,9 γ , O. I. C 8,7 γ .

Dieser Tabelle zufolge weist die Nährlösung von *Oospora lactis* C die Höchstwerte an Lactoflavin auf. Als vitaminärmster Stamm erweist sich *Oospora lactis* B, wo auch das Vitamin annähernd gleichmässig zwischen Nährlösung und Myzel verteilt ist. Dies trifft bei

den Stämmen A und C nicht zu. Bei *Oospora lactis* A ist nämlich der Hauptanteil an Lactoflavin im Myzel, während bei *Oospora lactis* C der weitaus grössere Teil des Wuchsstoffes in die Nährlösung übergeht. Mit steigendem Fettgehalt der Zellen scheint also die Permeabilität für Vitamin B₂ zu steigen.

Tabelle 9.

Gesamtgehalt an Aneurin, Lactoflavin und Verhältnis B₁/B₂.

Stamm	Gesamtgehalt B ₁	Gesamtgehalt B ₂	B ₁ /B ₂
<i>Oospora lactis</i> A	2,94 γ	3,1 γ	0,98
„ „ B	1,5 „	2,6 „	0,58
„ „ C	0,8 „	4,9 „	0,16

Der Gesamtgehalt an Lactoflavin ist bei allen drei Stämmen ziemlich gleich und im allgemeinen viel gleichmässiger verteilt als das Aneurin. Vergleicht man nun die relativen Verhältnisse der beiden Vitamine, dann ergibt sich, dass vor allem bei *Oospora lactis* C das Vitamin B₂ stark überwiegt, während *Oospora lactis* A fast gleiche Mengen B₁ und B₂ produziert.

8. Bestimmung der Nicotinsäure.

Nicotinsäure wirkt auf viele Bakterien, so *Bact. vulgare*, *B. dysenteriae*, *B. paratyphosum* A usw., begünstigt bei *Streptococcus lactis* die Milchsäurebildung. Die wachstumsfördernde Wirkung auf *Proteus*-Bakterien wird zu Bestimmungszwecken herangezogen. Ebenso die Farbreaktion mit 2,4-Dinitrochlorbenzol und mit Bromcyan. Die Bestimmung bei *Oospora lactis* zeigt im allgemeinen einen sehr geringen Nicotinsäuregehalt. Als Methode wurde die Bestimmung der Gelbfärbung gewählt. Die Färbung ergibt sich nach Behandlung der Nicotinsäure mit Bormcyan und Metol (p-Methylaminosulfat) (Bandier und Hald, 1939).

Da die Nicotinsäure meist in Form des Amids vorliegt, wurde zunächst das Nicotinsäureamid in die Nicotinsäure übergeführt und dann erst folgte die weitere Behandlung. 10 ccm werden mit 2,5 ccm 25%iger Salzsäure versetzt und zwei Stunden auf dem Wasserbade auf 90° C erhitzt, sodann 15% Natronlauge bis zur schwach kongosauren Reaktion zugefügt. Nach erfolgtem Eindampfen zur Trockene wird der Rückstand in 9 ccm n/15 KH₂PO₄ gelöst und 5 Minuten lang auf dem Wasserbade erwärmt. Nach Hinzufügen von 1 ccm 4%iger Bromcyanlösung wird weitere 5 Minuten erhitzt und schliesslich abgekühlt. Hierauf werden 10 ccm frisch bereiteter, kalt gesättigter, wässriger Metollösung hinzugefügt und nach einstündigem Stehen unter Lichtabschluss die gelbe Färbung im Pulfrich-Photo-

meter gemessen. Benützt wird das Filter S 43. Als Kompensationsflüssigkeit dient ein entsprechendes Gemisch aus 9 ccm KH_2PO_4 , 1 ccm Bromcyan und 10 ccm Metol.

Die in den Extrakten aus *Oospora* gefundenen Nicotinsäuremengen sind sicher zu klein, da bei der Zerlegung des Wuchsstoffgemisches ein Teil des Nicotinsäureamids in die verschiedenen Fraktionen mitgeht. Ich habe nämlich bei Versuchen mit synthetischem Nicotinsäureamid gefunden, dass bei der Fällung des Nicotinsäureamids Fällungsdauer und Konzentration eine grosse Rolle spielen. Diese Faktoren müssen aber bei der Trennung der einzelnen Wuchsstoffe auch für andere Fraktionen berücksichtigt werden, so dass nicht immer die besten Fällungsbedingungen für das Nicotinsäureamid gegeben sind. So löst sich ein Teil des Amids in Äther und Chloroform. Bei der Bleiacetatfällung bleibt das Amid in Lösung. Es ist aber wahrscheinlich, dass bei der Kohleadsorption, die im schwach sauren Bereich durchgeführt wird, nur ein Teil des Amids an Kohle adsorbiert wird. Auch der Waschalkohol, der vor der Kohleelution verwendet wird, dürfte kleine Mengen des Nicotinsäureamids enthalten. Immerhin steht zu erwarten, dass bei gleicher Methodik die gefundenen Werte erstens die Frage beantworten, welcher der drei untersuchten *Oospora*-Stämme am meisten Nicotinsäure erzeugt, und zweitens Einblick in die Grössenordnung der gebildeten Nicotinsäuremenge gestattet. Tabelle 10 zeigt die Eichkurve.

Tabelle 10.

Nicotinsäurekurve mittels des Pulfrichphotometers bestimmt.

Nicotinsäure	Durchlässigkeit	Extinktion
3 γ	95	0,022
5 „	87	0,061
7 „	83	0,081
10 „	79	0,102
15 „	69	0,161
20 „	61	0,215
30 „	51	0,292

Tabelle 11 weist die Resultate der Bestimmung auf.

Tabelle 11a.

Bestimmung der Nicotinsäure im Myzel.

Stamm	Durchlässigkeit	Extinktion	Nicotinsäure in 10 ccm Extrakt	Nicotinsäure in 20 ccm Extrakt	mg%
<i>Oospora lactis</i> A	95	0,022	3 γ	6 γ	0,084
„ „ B	91	0,041	4 „	8 „	0,12
„ „ C	89	0,051	5 „	10 „	0,17

Tabelle 11b.

Bestimmung der Nicotinsäure in der Nährlösung.

Stamm	Durchlässigkeit	Extinktion	Nicotinsäure in 10 ccm Extrakt	Nicotinsäure in 20 ccm Extrakt	1000 ccm Nlsg enthalten Nic. sre
<i>Oospora lactis</i> A	95	0,022	3 γ	6 γ	6 γ
" " B	91	0,041	4 "	8 "	8 "
" " C	95	0,022	3 "	6 "	6 "

Die Gesamtproduktion für 10 g Trockenmyzel beträgt: *Oospora lactis* A 17,1 γ , *Oospora lactis* B 24,2 γ , *Oospora lactis* C 26,6 γ .

Demnach ist also der fettärmste Stamm *Oospora lactis* A am nicotinsäureärmsten. Der fettreiche Stamm C enthält die höchsten Nicotinsäure-Mengen. Die Nicotinsäure verhält sich also konform zum Fettgehalt der Zellen. — Weiter ist ersichtlich, dass die Nicotinsäure nicht nur auf das Myzel beschränkt ist, sondern dass nahezu die gleichen Mengen in der Nährlösung aufgefunden werden.

9. Die Austestung des Wuchsstoffes MR Schopfer auf *Rhizopus suinus*.

Ebenso wie MP ist auch MR aus Getreidekeimlingen extrahierbar. Der Wuchsstoff ist wasser- und alkohollöslich, in Äther unlöslich, doch von geringerer Alkali- und Thermoresistenz als MP. Ferner wird MR von Tierkohle nicht adsorbiert. A. Janke und F. Sorgo (1939) behandeln aus *Aspergillus niger* gewonnene Wuchsstoffkonzentrate mit Medizinalkohle und untersuchten das Filtrat, welches ausser dem Faktor MR noch den Wuchsstoff B₂ nach Nielsen enthielt. *Aspergillus niger* und *Rhizopus suinus* wurden stark gefördert, während das Präparat auf *Phycomyces Blakesleeanus* ohne merklichen Einfluss blieb. Diese und weitere Versuche machen es wahrscheinlich, dass der *Aspergillus*-Wuchsstoff B₂ nach Nielsen mit dem *Rhizopus*-Wuchsstoff MR nach Schopfer wesensgleich ist.

Die Austestung erfolgte mit *Rhizopus suinus* als Testorganismus, der einer mit gestaffelten Extraktmengen versehenen Nährlösung eingepflegt wurde. In der Tabelle wird der Nielsenfaktor angegeben. Als Gefässe werden Glaskappenflaschen benutzt, welche mit je 20 ccm geimpfter Nährlösung beschickt werden. Die Einsaatdichte beträgt 10 Millionen Sporen pro Liter Nährlösung. Nach 7-tägiger Kulturdauer bei 26° C werden die Mycelien durch vortarierte Sintertiegel 1 G 3 filtriert und mit je 50 ccm heissem Wasser gewaschen. Dann wird im Trockenschrank bei 110° C bis zur Gewichtskonstanz, also etwa 3 bis 5 Stunden lang getrocknet. Nach dem Ab-

kühlen wird auf einer Dämpfungswaage gewogen und der Nielsenfaktor f errechnet.

Die Nährlösung hat folgende Zusammensetzung (Nielsen und Hartelius 1942):

prim. Kaliumphosphat . . .	0,5 g
Magnesiumsulfat . . .	0,5 g
Ammoniumtartrat . . .	10,0 g
Glucose	10,0 g
Ferrichloridlösung 1% . . .	10 Tropfen
doppelt dest. Wasser . . .	1000 ccm

Die Nährlösung wird bei 110° C 30 Minuten lang erhitzt. Die Glucose wird separat sterilisiert.

Tabelle 12a.

Austestung des Wuchsstoffes MR aus dem Myzel.					
Stamm	Wuchsstoff- zusatz in Vol. %	mg Trockengewicht		Mittelwert	Faktor f
		I	II		
<i>Oospora lactis</i> A	0	81,5	82,0	81,7	—
	1	83,0	86,5	84,7	1,0
	3	83,5	89,0	86,2	1,1
	5	87,5	92,0	89,7	1,1
<i>Oospora lactis</i> B	0	80,5	81,5	81,0	—
	1	84,5	85,0	84,7	1,0
	3	90,0	87,0	88,5	1,1
	5	96,0	94,5	95,5	1,2
<i>Oospora lactis</i> C	0	81,0	82,5	81,8	—
	1	86,5	87,0	86,8	1,1
	3	89,5	90,5	89,5	1,1
	5	95,0	94,0	94,5	1,2

Tabelle 12b.

Austestung des Wuchsstoffes MR aus der Nährlösung.					
Stamm	Wuchsstoff- zusatz in Vol. %	mg Trockengewicht		Mittelwert	Faktor f
		I	II		
<i>Oospora lactis</i> A	0	82,5	81,0	81,8	—
	1	86,5	88,0	87,3	1,1
	3	90,5	91,5	91,0	1,1
	5	94,5	95,0	94,8	1,2
<i>Oospora lactis</i> B	0	85,5	85,0	85,8	—
	1	110,5	97,0	103,8	1,3
	3	113,0	112,0	112,5	1,3
	5	117,0	116,5	116,8	1,4
<i>Oospora lactis</i> C	0	79,5	81,0	80,3	—
	1	85,5	84,5	85,0	1,1
	3	89,5	88,0	88,8	1,1
	5	94,5	93,5	94,0	1,2

Wie aus den Tabellen ersichtlich, besteht im Wuchsstoff-Gehalt der einzelnen Stämme fast kein Unterschied. Weiter ist ersichtlich, dass der Wuchsstoff MR nahezu gleichmässig in Nährlösung und Myzel verteilt ist. Am stärksten wirkt der Extrakt aus der Nährlösung von *Oospora lactis* B, am schwächsten die Fraktion aus dem Myzel von *O. lactis* A. Wenn man die Gesamtmenge des produzierten Wuchsstoffes MR der einzelnen Stämme betrachtet, so erweist sich, dass *O. lactis* B am meisten, dagegen *O. lactis* A am wenigsten an Wuchsstoff produziert.

Tabelle 13.

<i>Oospora lactis</i>	Wuchsstoffzusatz	Faktor f
A Myzel	5 Vol. %	1,1
A Nährlösung	5 "	1,2
B Myzel	5 "	1,2
B Nährlösung	5 "	1,4
C Myzel	5 "	1,2
C Nährlösung	5 "	1,2

10. Die Austestung des Wuchsstoffes B₂ nach Nielsen auf *Aspergillus niger*.

Die Austestung des Wuchsstoffes Nielsen B₂ gestaltet sich ähnlich, wie die Austestung des Wuchsstoffes MR.

Als Testorganismus dient hier *Aspergillus niger* Stamm Wehmer. Die mit 10 Millionen Konidien pro Liter geimpfte Nährlösung wird in Mengen von je 20 ccm in Glaskappenflaschen abgefüllt und mit gestaffelten Mengen des Wuchsstoffes versehen. Nach 7-tägiger Kultur bei 26° C, wird das Myzel durch vortarierte Glasintertiegel 1 G 3 filtriert, mit 50 ccm heissem Wasser gewaschen, bei 110° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und auf einer Dämpfungswaage gewogen. Wuchsstoffzusatz, Trockengewicht sowie der Nielsenfaktor sind in den Tabellen zusammengefasst.

Die bei der Austestung benützte Nährlösung hat folgende Zusammensetzung (Nielsen und Hartelius):

prim. Kaliumphosphat	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Ammoniumsulfat	2,0 g
Ferrosulfatlösung 1%	0,5 ccm
Saccharose	50,0 g
doppelt dest. Wasser	1000 ccm

Die Nährlösung wird 30 Minuten auf 110° C erhitzt. Die Saccharose wird getrennt sterilisiert.

Tabelle 14a.

Austestung des Wuchsstoffes Nielsen B₂ aus dem Myzel.

Stamm	Wuchsstoff- zusatz in Vol. %	mg Trockengewicht		Mittelwert	Faktor f
		I	II		
<i>Oospora lactis</i> A	0	220,5	221,0	220,8	—
	1	290,5	296,0	293,3	1,3
	3	304,0	305,5	304,8	1,4
	5	307,0	309,5	308,3	1,4
<i>Oospora lactis</i> B	0	219,5	223,0	221,3	—
	1	271,5	269,0	270,3	1,2
	3	315,5	312,5	314,0	1,4
	5	324,5	319,0	321,8	1,5
<i>Oospora lactis</i> C	0	219,5	221,0	220,2	—
	1	305,0	307,5	306,3	1,4
	3	346,0	340,0	343,0	1,6
	5	347,5	351,0	349,8	1,6

Tabelle 14b.

Austestung des Wuchsstoffes Nielsen B₂ aus der Nährlösung.

Stamm	Wuchsstoff- zusatz in Vol. %	mg Trockengewicht		Mittelwert	Faktor f
		I	II		
<i>Oospora lactis</i> A	0	220,5	219,0	219,8	—
	1	261,5	264,0	262,8	1,2
	3	297,0	301,0	299,0	1,4
	5	299,0	308,5	303,8	1,4
<i>Oospora lactis</i> B	0	230,5	221,5	226,0	—
	1	274,5	271,0	272,5	1,2
	3	305,5	306,0	305,8	1,4
	5	307,5	309,5	309,0	1,4
<i>Oospora lactis</i> C	0	219,5	218,5	219,0	—
	1	309,0	311,5	310,3	1,5
	3	346,0	340,0	343,0	1,6
	5	347,0	351,0	349,0	1,6

Die Austestung dieser Fraktion führt zu folgendem Ergebnis. Der Wuchsstoff ist ziemlich gleichmässig zwischen Nährlösung und Myzel verteilt. Der an Wuchsstoff reichste Stamm ist *O. l. C*, obwohl die Unterschiede zwischen den drei untersuchten Stämmen verhältnismässig gering sind.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse bringt folgende Tabelle.

Tabelle 15.

<i>Oospora lactis</i>	Wachsstoffzusatz	Faktor f
A Myzel	5 Vol. %	1,4
A Nährlösung	" "	1,4
B Myzel	" "	1,5
B Nährlösung	" "	1,4
C Myzel	" "	1,6
C Nährlösung	" "	1,6

Die Ähnlichkeit dieser Versuchsergebnisse mit jenen der MR-Fraktion stehen in gutem Einklang mit den Befunden von Janke und Sorgo (1939), deren Versuche die Wesensgleichheit des Schimmelpilzwachsstoffes B₂ von Nielsen mit dem Wachsstoff MR nach Schopfer als wahrscheinlich erscheinen lassen.

11. Biotinbestimmung nach Nielsen und Hartelius.

Bei der Wahl der Bestimmungsmethode erhebt sich vor allem die Frage nach dem geeigneten Testorganismus. Zumeist wurde Hefe verwendet (Kögl und Tönnis 1936, Tönnis und v. Hasselt 1936). Die besonders biotinarmer Hefe *Rasse M* wird auf der Reader-Nährlösung gezogen und die Suspensionsdichte nephelometrisch gemessen. Dabei bezeichnet die *Saccharomyces*-Einheit diejenige Biotin-Menge, welche 100%-igen Zuwachs bewirkt. Nun berücksichtigt aber diese Methode nicht die anderen etwa vorhandenen Hefewachsstoffe. Die erhaltenen Werte sind daher oft weit höher als dem tatsächlichen Biotingehalt entsprechen würde. Fast dieselbe Methode wurde von Robbins und Schmidt (1939) verwendet, jedoch mit *Nematospora (Ashbya) gossypii* als Testorganismus. Der auf Baumwollsträuchern parasitierende Ascomycet spricht noch in Verdünnung 1 : 250 000 000 000 lebhaft auf Biotin an und zwar sowohl auf das Biotin allein als auch zusammen mit Aneurinchlorid und Mesoinosit. Ein anderer Ascomycet, *Lophodermium pinastri*, wächst auf synthetischen Nährböden überhaupt nur dann, wenn neben Biotin zugleich auch Aneurin als Co-Wachsstoff geboten wird. Den genannten Pilzen geht offenbar die Fähigkeit der Biotinsynthese ab. Hier sei die physiologisch interessante Frage eingeschaltet, ob jene Pilze, auf welche das Biotin nicht wirkt und zu denen auch *Polyporus adustus* und *Phycomyces Blakesleeanus* zählen, des Wachsstoffes überhaupt nicht bedürfen, oder ob sie ihn selbst zu synthetisieren vermögen und daher auf die Zufuhr von aussen nicht reagieren. Nachdem nun Kögl fand, dass *Phycomyces* und *Polyporus* sehr biotinreich sind, erscheint es wahrscheinlich, dass auch für sie Biotin von Bedeutung ist.

Zur Biotinbestimmung sind ferner *Rhizobium trifolii* und *Lactobacillus arabinosus* verwendet worden.

In vorliegender Arbeit wird die Methode von Nielsen und Hartelius (1942) mit Hefe als Testorganismus gewählt. Sie beruht darauf, dass zwei Parallelreihen aufgestellt werden, von denen der Kontrollreihe Biotin in optimaler Menge zugesetzt wird. In beide Reihen kommen nun steigende Mengen des fraglichen Präparates. Die Parallelgläser der Versuchsreihe, welche das gleiche Wachstum aufweisen wie die entsprechenden Röhren der Kontrollreihe, enthalten die optimale Biotinmenge. Durch die Vergleichsreihe werden Fehler, die durch die Einwirkung anderer, auf die Hefe wirksamer Stoffe entstehen, ausgeglichen. Auf diese Weise wird also nicht die Wirkung aller im Präparate das Hefewachstum fördernder Stoffe ermittelt, und zu hohe Werte vermieden. Mit dieser Methode können noch 0,13 m γ Biotin pro ccm erfasst werden. Kleinere Biotinmengen bis 0,004 m γ herab, lassen sich mit *Bact. radicicola* bestimmen, allerdings mit geringerer Genauigkeit. Die Hefemethode arbeitet mit 10% Genauigkeit. Die von Nielsen angegebene Nährlösung hat folgende Zusammensetzung:

Rohrzucker	50,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g
NaCl	0,5 g
CaCl ₂	0,4 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,7 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	5,0 mg
Asparagin	0,2 g
Aneurin	50 γ
β -Alanin	120 γ
Aq. bidest.	1000 ccm

Als Biotin wird ein Eigelbextrakt nach den Angaben von Nielsen benutzt und folgendermassen hergestellt. 5 g getrocknetes Eidotter werden mit 200 ccm Wasser 15 Minuten lang erhitzt. In einem ccm dieses Extraktes sind 30 m γ Biotin enthalten.

Zunächst wird die Empfindlichkeit verschiedener Hefen auf Biotin geprüft. Dabei erweisen sich die Hefen *Lft. 73* und *Saccharomyces cerevisiae Stamm 55* als die empfindlichsten. Dagegen sind *Presshefe* (altes und neues Verfahren), *Spiritushefe* und obergärige *Bierhefe* weniger empfindlich. Tabelle 16 zeigt die Einwirkung gestaffelter Biotinmengen auf *Lft. 73* und *Saccharomyces cerevisiae 55*. Als Gefässe werden hier Glaskappenflaschen verwendet. Die Nährlösungsmenge beträgt 50 ccm pro Flasche. Zu 1 Liter Nährlösung werden 150 mg Hefe zugesetzt. Nach 48-stündiger Kultur wird durch Sintertiegel 1 G 4 abfiltriert und bei 110° C getrocknet. Sodann wird gewogen.

in optimaler Menge zugesetzt (4 ccm Eidotterextrakt pro Liter Nährlösung) und in die Gläser der Kontrollreihe pipettiert. Alle Parallelgläser (mit und ohne Biotinzusatz) erhalten die jeweilige gleiche Menge der zu untersuchenden *Oospora*-Fraktion.

Tabelle 18b.

Bestimmung des Biotingehaltes der Biotinfraktion:
Fraktion aus der Nährlösung.

Stamm	Extraktzusatz pro 15 ccm	Hefezellen in 0,1 mm ³	
		Nährsg. mit Biotinzusatz	Nährsg. ohne Biotinzusatz
<i>Oospora lactis</i> A	2,0 ccm	850	885
	1,0 "	920	792
	1,0 "	870	784
	0,5 "	917	693
	0,5 "	883	662
	0,25 "	896	478
	0,25 "	875	564
	0,1 "	859	324
	0,1 "	844	420
<i>Oospora lactis</i> B	2,0 ccm	910	862
	1,0 "	875	893
	1,0 "	823	866
	0,5 "	917	693
	0,5 "	884	824
	0,25 "	897	779
	0,25 "	854	737
	0,1 "	813	326
	0,1 "	874	304
<i>Oospora lactis</i> C	2,0 ccm	837	885
	1,0 "	839	856
	1,0 "	982	842
	0,5 "	826	837
	0,5 "	798	805
	0,25 "	895	621
	0,25 "	876	598
	0,1 "	859	324
	0,1 "	867	386

Tabelle 19a.

Bestimmung des Biotingehaltes der Thiaminfraktion;
Fraktion aus dem Myzel.

Stamm	Extraktzusatz pro 15 ccm	Hefezellen in 0,1 mm ³	
		Nährlg. mit Biotinzusatz	Nährlg. ohne Biotinzusatz
<i>Oospora lactis</i> A	2,0 ccm	818	881
	1,0 "	873	848
	1,0 "	843	820
	0,5 "	854	814
	0,5 "	825	856
	0,25 "	889	801
	0,25 "	872	832
	0,1 "	853	530
	0,1 "	834	542
<i>Oospora lactis</i> B	2,0 ccm	859	843
	1,0 "	783	481
	1,0 "	812	481
	0,5 "	805	397
	0,5 "	798	349
	0,25 "	814	362
	0,25 "	893	304
	0,1 "	867	321
	0,1 "	804	385
<i>Oospora lactis</i> C	2,0 ccm	867	805
	1,0 "	821	872
	1,0 "	852	844
	0,5 "	879	827
	0,5 "	851	833
	0,25 "	868	857
	0,25 "	881	874
	0,1 "	847	579
	0,1 "	862	823

Wie aus Tabelle 18 a (*Oospora* A, Myzel) hervorgeht, wird das Optimum bei Zusatz von 1 ccm Extrakt erreicht. Der Biotingehalt dieser Fraktion beträgt demnach 30 m γ für 20 ccm der Fraktion.

Tabelle 19b.

Bestimmung des Biotingehaltes der Thiaminfraktion;
Fraktion aus der Nährlösung.

Stamm	Extraktzusatz pro 15 ccm	Hefezellen in 0,1 mm ³	
		Nährlsg. mit Biotinzusatz	Nährlsg. ohne Biotinzusatz
<i>Oospora lactis</i> A	2,0 ccm	889	829
	1,0 "	847	825
	1,0 "	853	856
	0,5 "	869	962
	0,5 "	823	892
	0,25 "	782	825
	0,25 "	910	770
	0,1 "	884	635
	0,1 "	867	578
<i>Oospora lactis</i> B	2,0 ccm	828	928
	1,0 "	848	818
	1,0 "	981	857
	0,5 "	821	692
	0,5 "	851	770
	0,25 "	892	461
	0,25 "	854	414
	0,1 "	807	246
0,1 "	852	305	
<i>Oospora lactis</i> C	2,0 ccm	873	827
	1,0 "	814	885
	1,0 "	862	848
	0,5 "	825	801
	0,5 "	927	879
	0,25 "	846	823
	0,25 "	882	867
	0,1 "	822	514
0,1 "	880	463	

Der Biotingehalt des Extraktes aus der Nährlösung beläuft sich auf 15 m γ . Die ermittelten Werte aus der Biotin- und Thiaminfraktion wie auch die Summen sind in folgender Tabelle enthalten.

Tabelle 20.

<i>Oospora lactis</i>	Biotingehalt		Gesamtbiotin- gehalt
	Biotinfraktion	Thiaminfraktion	
A Myzel	30 m γ	120 m γ	150 m γ
A Nährlösung	15 "	120 "	135 "
B Myzel	120 "	15 "	135 "
B Nährlösung	60 "	30 "	90 "
C Myzel	60 "	120 "	180 "
C Nährlösung	60 "	120 "	180 "

(Berechnet auf Grund der Angaben von Nielsen und Hartelius. 1 ccm des Eidotterextraktes enthält 30 m γ Biotin).

Sowohl die Biotinfraktion, als auch die Thiaminfraktion, welche ebenfalls auf ihren Biotingehalt untersucht wird, scheinen keine anderen Wuchsstoffe ausser Biotin und Thiamin in nennenswerten Mengen zu enthalten, da bei der Austestung Werte erzielt werden, die auf die alleinige Wirkung des Biotins (eventuell auch Aneurins) zurückzuführen sind. Bei Zusetzung der einzelnen Fraktionen zu den Kontrollreihen, welchen die optimalen Biotinmengen zugeführt wurden, werden keine wesentlich höhere Werte erzielt, die bei Vorhandensein von Wuchsstoffen, ausser Biotin, erheblich grösser wären. Der zusätzlichen Wirkung des Thiamins auf die Test-Hefe wird von vornherein durch Zugabe von optimalen Thiaminmengen zur Nährlösung begegnet.

Aus der Tabelle 20 ergibt sich, dass dem Stamm C die höchsten Biotinmengen zukommen und dass das Biotin gleich zwischen Myzel und Nährlösung verteilt ist. Das Verhältnis Biotin/Myzel-trockensubstanz ist folgendes.

Tabelle 21.

Verhältnis Biotin/Myzeltrockensubstanz.

Stamm	g Trockensubstanz	m γ Biotin	Biotin/Trockensubstanz
<i>Oospora lactis</i> A	7,11	150	1/47 · 10 ⁶
<i>Oospora lactis</i> B	6,55	135	1/49 · 10 ⁶
<i>Oospora lactis</i> C	5,80	180	1/30 · 10 ⁶

Schliesslich ist aus den Tabellen zu entnehmen, dass eine Trennung des Thiamins von Biotin, wie schon eingangs erwähnt, unter den gegebenen Verhältnissen nicht durchführbar ist. Denn während in den Biotinfraktionen von *O. l.* A und C die jeweils kleineren Mengen an Biotin vorhanden sind, ist bei der Biotinfraktion von *Oospora* B der Biotingehalt gegenüber dem Biotingehalt der Thiaminfraktion wesentlich grösser.

12. β -Alaninbestimmung nach Nielsen.

Nur in wenigen Fällen, etwa in den Wurzelknöllchen der Leguminosen, kommt das β -Alanin in grösseren Mengen vor. Meist aber ist die Produktion so gering, dass zum Nachweis eine besondere Methode, die von Nielsen und Hartelius (1941) herangezogen werden muss. Bereits R. J. Williams und E. Rohrmann (1936) konnten zeigen, dass das β -Alanin auf Hefepilze wachstumsfördernd wirkt. Kögl (1937) bestätigte die Wirksamkeit bei Asparaginsäure- und Inositanwesenheit. Auf *Nematospora*, die auf Biotin stark anspricht, ist indessen β -Alanin unwirksam und zwar sowohl mit Inosit als auch in Kombination Biotin-Inosit-Aneurin.

Beim Test wird daher mit einer empfindlichen Hefe gearbeitet, deren Wachstum auf das Doppelte bis Dreifache gesteigert werden kann. Den Ausgangspunkt dieser Methode bildet die Beobachtung, dass die Wirkung des β -Alanins ein scharfes Optimum zeigt. Weitere Gaben, welche das Optimum überschreiten, sind nahezu wirkungslos.

Die Methode der β -Alaninbestimmung ist ganz analog der der Biotinbestimmung, nur wird hier anstatt Biotin das Alanin den Kontrollreihen in optimalen Mengen zugesetzt. In beide Reihen — Versuchs- und Kontrollreihe — werden steigende Mengen des Präparates pipettiert. Die Nährlösung enthält die optimale Biotinmenge, die für die hier gewählte Hefe 4 ccm des Eidotterextraktes pro Liter Nährlösung beträgt. Mit dieser Methode können bis zu 0,13 γ β -Alanin pro ccm mit einer Genauigkeit von etwa 25% erfasst werden.

Als die empfindlichsten der untersuchten Hefen gegen β -Alanin erweisen sich die Hefen *Lft. 73* und *Saccharomyces cerevisiae Stamm 55*. In den Versuchen wird *Saccharomyces cerevisiae 55* verwendet. Die eingepflichte Hefemenge beträgt 30 mg pro Liter Nährlösung. Die Nährlösung hat folgende Zusammensetzung:

Saccharose	50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g
NaCl	0,5 g
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	0,4 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,7 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	5,0 mg
Aneurin	50 γ
Biotin-Präparat	4 ccm
doppelt dest. Wasser	1000 ccm

Diese Nährlösung wird ohne Saccharose und Biotin 30 Minuten bei 110° C erhitzt. Saccharose wird extra sterilisiert. Biotin wird in Form eines Eidotterextraktes zugesetzt.

Tabelle 22.

Wirkung gestaffelter β -Alaninmengen auf das Hefenwachstum.

Hefe	β -Alaninzusatz	Hefetrockensubstanz	
Lft. 73 2 mal auf synthetischer Nähr- lösung gezogen	0	9,5 mg	
	0	10,5 "	
	1 γ	13,5 "	
	1 "	14,5 "	
	2 "	17,5 "	
	2 "	16,0 "	
	3 "	16,5 "	
	3 "	18,0 "	
	Lft. 73 auf Würzeagar gezogen	0	11,0 mg
		0	10,5 "
1 γ		13,5 "	
1 "		12,0 "	
2 "		15,5 "	
2 "		15,0 "	
3 "		15,5 "	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm 55 auf synthetischer Nährlösung gezogen	0	8,0 mg	
	0	8,5 "	
	1 γ	14,0 "	
	1 "	13,5 "	
	2 "	18,0 "	
	2 "	19,0 "	
	3 "	19,5 "	
3 "	20,5 "		

Tabelle 23.

Bestimmung der optimalen β -Alaninmenge für *Saccharomyces cerevisiae* Stamm 55.

β -Alaninzusatz	Hefetrockengewicht
0	9,0 mg
0	8,5 "
2 γ	17,5 "
2 "	18,5 "
2,3 "	20,0 "
2,3 "	19,5 "
2,5 "	20,5 "
2,5 "	19,0 "
2,7 "	20,0 "
2,7 "	18,5 "
2,9 "	19,0 "
2,9 "	20,5 "
3,0 "	19,5 "
3,0 "	18,0 "

Das Biotinpräparat wird auf die bei der Biotinaustestung beschriebene Weise hergestellt. Nach 12-stündiger Kulturdauer wird die Hefe mittels eines Glassintertiegels 1 G 4 abfiltriert, mit 50 ccm heissem Wasser gewaschen, im elektrischen Trockenschrank bei 105° C getrocknet und auf einer Dämpfungswaage gewogen.

Tabelle 23 zeigt die Ermittlung der optimalen β -Alaninmengen für *Saccharomyces cerevisiae* 55. Als optimal für diese Hefe erwiesen sich 2,3 γ pro 50 ccm Nährlösung. Diese Menge wird den Reihen mit den Kontrollversuchen zugesetzt.

Demnach wirken 2,3 γ β -Alanin auf diesen Stamm optimal. Auf diese Zahl stützt sich auch die weitere Berechnung des β -Alanins im Konzentrat.

Tabelle 24a.

Bestimmung des β -Alaningehaltes des Myzels.

Stamm	Extraktzusatz mg Hefetrockensubstanz		
	in ccm	Nährlösung mit β -Alanin	Nährlösung ohne β -Alanin
<i>Oospora lactis</i> A	2,0	19,5	20,0
	1,0	23,0	22,5
	0,6	20,0	23,5
	0,6	19,5	24,5
	0,2	22,5	21,0
	0,2	20,5	19,0
	0,1	21,0	15,5
	0,1	19,0	16,0
	0	18,5	8,5
	0	21,5	8,0
<i>Oospora lactis</i> B	2,0	19,5	18,5
	1,0	19,5	11,0
	0,6	21,5	10,0
	0,6	19,0	9,5
	0,2	21,5	9,0
	0,2	21,0	9,5
	0,1	19,5	8,0
	0,1	21,0	10,0
	0	21,0	9,5
	0	20,0	8,0
<i>Oospora lactis</i> C	2,0	19,0	15,5
	1,0	17,5	8,5
	0,6	20,5	8,5
	0,6	18,0	8,0
	0,2	18,5	9,0
	0,2	18,0	8,0
	0,1	21,0	8,5
	0,1	22,0	10,0
	0	21,0	8,5
	0	23,5	9,0

Tabelle 24b.

Bestimmung des β -Alaningehaltes der Nährlösung.

Stamm	Extraktzusatz in ccm	mg Hefetrockensubstanz	
		Nährlösung mit β -Alanin	Nährlösung ohne β -Alanin
<i>Oospora lactis</i> A	2,0	20,5	24,5
	1,0	21,0	26,5
	0,6	25,1	22,0
	0,6	24,0	24,0
	0,2	21,0	23,5
	0,2	19,5	20,5
	0,1	22,0	16,5
	0,1	23,0	17,5
	0	21,5	8,0
	0	19,0	8,5
<i>Oospora lactis</i> B	2,0	21,5	20,5
	1,0	18,5	13,0
	0,6	20,0	12,5
	0,6	21,5	11,0
	0,2	19,0	10,5
	0,2	21,5	8,5
	0,1	20,5	11,0
	0,1	19,0	7,5
	0	19,5	8,5
	0	22,0	9,5
<i>Oospora lactis</i> C	2,0	21,5	20,0
	1,0	17,5	19,5
	0,6	20,5	23,5
	0,6	19,0	20,0
	0,2	20,5	15,5
	0,2	21,5	14,0
	0,1	20,0	11,5
	0,1	19,0	9,5
	0	21,5	8,5
	0	21,0	7,5

Folgende Tabelle zeigt die Zusammenfassung der erzielten Resultate.

Tabelle 25.

<i>Oospora lactis</i>	β -Alaningehalt
A Myzel	230,0 γ
A Nährlösung	230,0 „
B Myzel	23,0 „
B Nährlösung	23,0 „
C Myzel	23,0 „
C Nährlösung	76,6 „

Bei der β -Alaninbestimmung zeigt sich, dass, nach der Erreichung des Optimums, durch weitere Zusätze von Oosporaextrakten keine wesentlich höheren Werte erzielt werden.

Aus den Tabellen ist ersichtlich, dass *Oospora lactis* A am β -Alanin-reichsten ist, die kleinsten β -Alaninmengen bei *Oospora lactis* B zu finden sind.

Während bei *Oospora lactis* A und B das β -Alanin zwischen Myzel und Nährlösung gleichmässig verteilt erscheint, ist bei *O. lactis* C die gefundene Menge an β -Alanin dreimal so gross als wie im Myzel.

Beim Vergleich des Biotin- und β -Alaningehaltes der einzelnen Fraktionen gelangt man zu folgenden Verhältnissen Biotin / β -Alanin:

Tabelle 26.

<i>Oospora lactis</i>	Biotingehalt	β -Alaningehalt	Biotin/ β -Alanin
A Myzel	150 m γ	230 γ	1/1533
A Nährlösung	135 „	230 „	1/1704
B Myzel	135 „	23,0 „	1/170
B Nährlösung	90 „	23,0 „	1/256
C Myzel	180 „	23,0 „	1/128
C Nährlösung	180 „	76,6 „	1/425

Daraus ergibt sich, dass bei allen drei Stämmen, sowohl in der Nährlösung wie auch im Myzel der β -Alaningehalt erheblich grösser als der Biotingehalt ist. Auf dieses Mengenverhältnis wies schon Nielsen (1941) hin und fand für die meisten von ihm untersuchten Substanzen Verhältnisse Biotin / β -Alanin zwischen 1/50 und 1/400. In diesen Grenzen halten sich *Oospora lactis* B und *Oospora lactis* C. Stärker weicht davon *O. lactis* A ab. Bei Hefepresssaft allerdings ist dieses Verhältnis zufolge Nielsen 1/10 000.

Während sich *O. lactis* A, wie schon erwähnt, als β -alaninreichster Stamm erweist, ist hinsichtlich des Biotingehaltes der Stamm C der wuchsstoffreichste. — Das β -Alanin beträgt den 1/31 000 bis 1/250 000 Teil der Myzeltrockensubstanz, was annähernd den gefundenen Werten bei Schweinsserum und Bierwürze entspricht (Nielsen und Hartelius 1941).

Tabelle 27.

Stamm	Verhältnis β -Alanin/Myzel - Trockensubstanz.		
	g Trockenst substanz	γ β -Alanin	β -Alanin/Trockensubstanz
<i>Oospora lactis</i> A	7,11	230	1/31 000
<i>Oospora lactis</i> B	6,55	23	1/290 000
<i>Oospora lactis</i> C	5,80	23	1/250 000

Zur Frage der Lokalisierung ist die Feststellung interessant, dass bei *O. l.* A und B das β -Alanin gleichmässig zwischen Myzel und Nährlösung verteilt ist. Der fettreichste Stamm C hingegen gibt einen Grossteil der Aminosäure an die Nährlösung ab. Die Permeabilität für β -Alanin scheint also mit dem Fettgehalt der Zellen zu steigen.

13. Zusammenfassung.

Bei drei Stämmen von *Oospora lactis* wird der Gehalt an folgenden Wuchsstoffen bestimmt: Thiamin, Wuchsstoff MP Schopfer, Lactoflavin, Nicotinsäure, Wuchsstoff MR, B₂ nach Nielsen, Biotin und β -Alanin. Die Stämme unterscheiden sich u. a. in ihrem Fettspeicherungsvermögen. Stamm A ist fettarm, B stärker fettbildend, Stamm C ist fettreich.

Es wird der Wuchsstoffgehalt sowohl im Myzelium wie auch in den Nährlösungen, auf denen die Stämme gewachsen sind, bestimmt. Die Extrakte aus den getrockneten Myzelien und der zur Trockne im Vakuum eingedampften Nährlösungen werden einer Zerlegung unterworfen und die einzelnen Fraktionen auf ihren Wuchsstoffgehalt geprüft. Diese Zerlegung wird im einzelnen beschrieben.

Zur Ermittlung des Thiamins wird die Methode von Schopfer angewandt. Der Thiamingehalt beträgt, bezogen auf 10 g Myzeltrockengewicht, 1,3 bis 4,3 γ . Der fettarmen *O. l. A* kommt der höchste Vitamingehalt zu. Er nimmt bei steigender Fettspeicherung ab. Die Hälfte des B₁-Gehaltes wird an das Substrat abgegeben. Thiamin ist sowohl in der „Thiamin“- als auch „Biotinfraktion“. Eine Trennung von Thiamin und Biotin ist somit unter den gegebenen Umständen nicht möglich.

Der Wuchsstoff MP wird ebenfalls mit *Phycomyces Blakesleanus* (+) ausgetestet. Die höchste Wuchsstoffmenge wird bei *O. l. B* gefunden. Der wuchsstoffärmste Stamm ist *O. l. C*, was mit dem Thiaminbefund übereinstimmt. Die Nährlösungen enthalten stets den grösseren Anteil.

Lactoflavin. Die photometrische Messung der Farbintensität zeigt folgendes: Der Lactoflavinegehalt bei *O. l. C* beträgt 8,7 γ . (bezogen auf 10 g Trockengewicht) und ist der höchste gefundene Wert. *O. l. A* synthetisiert 4,4 γ pro 10 g Trockengewicht. Demnach verhält sich das Vitamin B₂ entgegengesetzt zum Vitamin B₁. Lactoflavin wird an die Nährlösung abgegeben. Die Permeabilität für dieses Vitamin steigt mit dem Fettgehalt der Zellen.

Nicotinsäure. Gemessen wird die Gelbfärbung nach Behandlung mit Bromcyan und Metol. Die höchsten Nicotinsäure-Werte werden von *O. l. C* erzielt. Der Wuchsstoff verhält sich konform zum Fettgehalt der Stämme und somit entgegengesetzt zum Aneurin. Ebenso wie B₁ exosmiert auch Nicotinsäure zur Hälfte in die Nährlösung.

Der Wuchsstoff MR wird auf *Rhizopus suinus* ausgetestet. Alle Oosporastämme haben fast gleichen Wuchsstoffgehalt. Etwas stärker wirkt die Fraktion aus *O. l. B*. Der Wuchsstoff ist gleichmässig zwischen Myzel und Nährlösung verteilt.

Testorganismus für den Wuchsstoff B_2 Nielsen ist *Aspergillus niger*. Der Wuchsstoff ist gleichmässig zwischen Myzel und Nährlösung verteilt. Quantitativ sind die Unterschiede zwischen den Oosporastämmen gering. Die Versuche sprechen für die von Janke und Sorgo ausgesprochene Wahrscheinlichkeit der Wesensgleichheit des *Aspergillus*-Wuchsstoffes B_2 mit dem MR-Wuchsstoff.

Auf den Biotingehalt wird sowohl die Fällung wie auch die Lösung nach der Bleiacetatfällung bei pH 6,8 untersucht. Es wird die von Nielsen und Hartelius ausgearbeitete Methode gewählt. Der Biotingehalt der untersuchten Stämme bewegt sich zwischen 350 und 600 $m\gamma$ pro 10 g Trockensubstanz. Die höchsten Mengen synthetisiert *O. l. C.* Darin und auch in der ziemlich gleichmässigen Verteilung zwischen Myzel und Nährlösung verhält sich das Biotin analog dem Wuchsstoff B_2 Nielsen, der Nicotinsäure und dem Lactoflavin.

β -Alanin wird in analoger Weise bestimmt wie das Biotin. Der fettärmste Stamm *O. l. A* hat, ganz im Gegensatz zu Biotin und in Übereinstimmung mit Thiamin, den höchsten Wuchsstoffgehalt. Demnach ist auch der Quotient Biotin / β -Alanin bei *O. l. A* der weitest aus kleinste. Die Stämme A und B zeigen eine gleichmässige Verteilung der Aminosäure zwischen Myzel und Nährlösung. Der Stamm C hingegen gibt einen Grossteil an das Substrat ab. Hierin gleicht das Verhalten des β -Alanins dem des Lactoflavins. Wie es scheint, steigt die Permeabilität für die beiden Stoffe mit dem Fettgehalt der Zelle.

14. Literatur.

- Abderhalden, E., 1944. Lehrbuch d. physiol. Chem. Berlin und Wien, Urban und Schwarzenberg.
- Bandier, E., und Hald, J. 1939. Biochem. Journ. **33**.
- Bonner, J., und Buchmann, E. R., 1939. Proc. Acad. natur. Sci. Philad. **25**.
- Bünning, E., 1934. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **52**.
— 1934. Naturwiss. **22**.
- Burgeff, H., 1934. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **52**.
- Dagys, J., 1937. Protoplasma **28**.
— 1935. Protoplasma **24**.
- Euler, H. v., Myrbäck, K., und Mitarbeiter, 1930. Ztschr. physiol. Chemie **190**.
— und Mitarbeiter, 1931. Ebenda **199**.
- Geffers, H., 1937/38. Zbl. Bakt. II. **97**.
- Guttenberg, H. v., 1935. Fortschr. d. Bot. **5**.
- Henneberg, 1904. Wochenschrft. f. Brauerei.
- Janke, Alex., 1939. Zbl. Bakt. II. **100**.
- Janke, Alex., und Sorgo, Fr., 1939. Arch. f. Mikrobiol. **10**.
- Kögl, Fritz, und Tönnis, B., 1936. Zeitschr. Physiol. Chem. **242**.
- Kögl, F., und Hasselt, H. v., 1936. Ebenda **243**.

- Kögl, F., und Fries Nils, 1937. Ebenda **249**.
- Linneboe, J. B., und Hastings, E. G., 1935/36. Zbl. Bakt. II. **93**.
- Miller, W. L., Eastcott, E. V., and Sparling, A. M., 1932. Trans. Roy. Soc. Canada, Sect. III. Vol. **26** (3).
- Müller, W., 1937. Ber. Schweiz. bot. Ges. **47**.
- Nielsen, N. und Hartelius, V., 1938. Biochem. Z. **285**.
- — 1938. C. r. Carlsberg, Sér. physiol. **22**.
- — 1939. Ebenda **22**.
- — 1939. Biochem. Z. **301**.
- Nielsen, N., und Johansen Gordon, 1941. C. r. Carlsberg, Sér. physiol. **23**.
- Nielsen, N. und Hartelius, V., 1941. Ebenda **23**.
- — 1942. Ebenda **23**.
- Ritter, U., 1931. Zbl. Bakt. II., **83**.
- Robbins, W. J., und Kavanagh, F., 1938. Plant Physiol. **13**.
- — 1938. Amer. J. Bot. **25**.
- — 1938. Proc. Acad. natur. Sci. Philad. **24**.
- Robbins, W. J. und Schmidt, M. B., 1939. Bulletin Torrey Bot. Club **66**.
- Rullmann, 1907. Zbl. Bakt. II. **18**.
- Scheunert, A. und Schieblich, M., 1923. Biochem. Ztschr. **139**.
- Schnell, E., 1912. Zbl. Bakt. II., **35**.
- Schopfer, W. H., 1934 a. Arch. Mikrobiol. **5**.
- 1934. Ber. Schweiz. bot. Ges. **43**.
- 1935. Arch. Mikrobiol. **6**.
- Schopfer, W. H., und Jung, A., 1938. Z. Vitaminforsch. **7**.
- Schopfer, W. H., 1937. Protoplasma **28**.
- Schopfer, W. H., und Blumer, S., 1938. Arch. Mikrobiol. **9**.
- Schopfer, W. H., 1939. Ergebn. Biol. **16**.
- 1938. Protoplasma **31**.
- Schropp, W., und Scharrer, K., 1933, Jb. wiss. Bot. **78**.
- Thren, R., 1941. Vit. und Hormone **1**.
- Umrath, K. 1939. Protoplasma **33**.
- Warburg, O. und Christian, W., 1935. Biochem. Ztschr. **275**.
- — 1935. Ebenda **282**.
- — 1936. Ebenda **255**.
- — 1936. Ebenda **287**.
- Wildiers, E., 1901. La Cellule. **18**.
- Willaman, J. J., 1920. J. amer. chem. Soc. **42**.
- Williams, R. J. und Rohrman, E., 1936. J. amer. chem. Soc. **58**.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sydowia](#)

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: [4](#)

Autor(en)/Author(s): Kuchar Karl Wilhelm

Artikel/Article: [Die Wuchsstoffe bei Oospora lactis \(Fres.\) Sacc. 409-449](#)