

Für das Anion des daraus gewonnenen Natriumsalzes fanden wir:

$$[\alpha]_D^{20}: (-0.32^\circ \times 100) : (1.237 \times 1) = -25.3^\circ \text{ (Wasser).}$$

### 3) Biologische Wirksamkeit.

a) Hemmungsversuche: Die Nährlösung, in der das *Streptobacterium plantarum* Orla-Jensen (Stamm 10 S) wuchs, hatte die von R. Kuhn und Th. Wieland<sup>13)</sup> angegebene Zusammensetzung. An Stelle der Vitamin-Fraktion aus Thunfischleber enthielt jedoch 1 ccm der Nährlösung 0.033 ccm eines Biotin-Konzentrats aus Hefe, für dessen Überlassung wir Hrn. Dr. K. Schwarz danken, + 0.017 ccm einer Lösung von *p*-Amino-benzoessäure 1 : 1 000 000. Überdies wurde die sicher optimale Menge von (+)-Pantothensäure (0.025  $\gamma$ /ccm Nährlösung) als Bariumsalz zugesetzt. Diesem Medium wurden steigende Mengen der Acyltaurine als Natriumsalz zugefügt. Beimpft wurde mit Platinösen aus einer Reinkultur in dem eben angegebenen Grundmedium. Das Wachstum wurde nach 2 Tagen lichtelektrisch gemessen<sup>14)</sup>.

b) Enthemmungsversuche: Die Pantothensäure wurde aus der Nährlösung weggelassen. Bei jeder geprüften Konzentration des rechtsdrehenden Acyltaurins gaben wir in einem großen Bereich nach 2er-Potenzen gestaffelte Mengen von rechtsdrehendem, pantothensaurem Barium zu.

## 215. Ernst Friedrich Möller und Klaus Schwarz: Der Wuchsstoff H', ein Antagonist der Sulfanilamide, bei *Streptobacterium plantarum* (Orla-Jensen); Wachstum von *Streptobacterium plantarum* in Nährlösungen aus chemisch genau definierten Verbindungen.

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

(Eingegangen am 7. August 1941.)

Die Milchsäurebakterien gehören hinsichtlich ihrer Ernährung zu den anspruchsvollsten Bakterien, sie sind in mancher Beziehung sogar anspruchsvoller als der Mensch und die höheren Tiere<sup>1)</sup>. Neben Salzen und einem verärbaren Kohlenhydrat sind nicht nur eine große Anzahl von Aminosäuren, sondern auch viele Wuchsstoffe zum Wachstum unerläßlich. Bis jetzt sind folgende Wuchsstoffe mit Sicherheit als unbedingt notwendig erkannt: Lactoflavin<sup>1)</sup>, Adermin<sup>2)</sup>, Nicotinsäure<sup>3)</sup>, Panthothensäure<sup>3)</sup>, Adenin<sup>4)</sup> und Biotin<sup>4)</sup>.

<sup>13)</sup> B. 78, 965 [1940].

<sup>14)</sup> Vergl. E. F. Möller, Ztschr. physiol. Chem. 254, 285 [1938]; 260, 246 [1939].

<sup>1)</sup> S. Orla-Jensen, The Lactic Acid Bacteria, Kgl. danske Vidensk. Selsk. Skr., naturvidensk. math. Afdel. 8, V, 2 [1919].

<sup>2)</sup> E. F. Möller, Ztschr. physiol. Chem. 254, 285 [1938].

<sup>3)</sup> E. E. Snell, F. M. Strong u. W. H. Peterson, Journ. Amer. chem. Soc. 60, 2825 [1938].

<sup>4)</sup> E. F. Möller, Ztschr. physiol. Chem. 260, 246 [1939].

In einem geeigneten Medium, das alle diese Wuchsstoffe enthält, ist aber das Wachstum vieler Milchsäurebakterien noch immer nicht möglich.

Die fehlende Substanz ist in Konzentraten des Filtratfaktor-Komplexes aus Reiskleie, Hefe und Thunfischleber vorhanden, worauf schon der eine von uns hinwies<sup>4)</sup>. Wir nannten diesen Faktor H', da er zuerst in Konzentraten des Hautschutzvitamins H gefunden wurde. Einen einwandfreien Test für diesen Wuchsstoff konnten wir ausarbeiten, nachdem die Pantothensäure in chemisch reiner Form vorlag. Als H'-freies Grundmedium hat sich die in der Tafel angegebene Nährlösung bewährt.

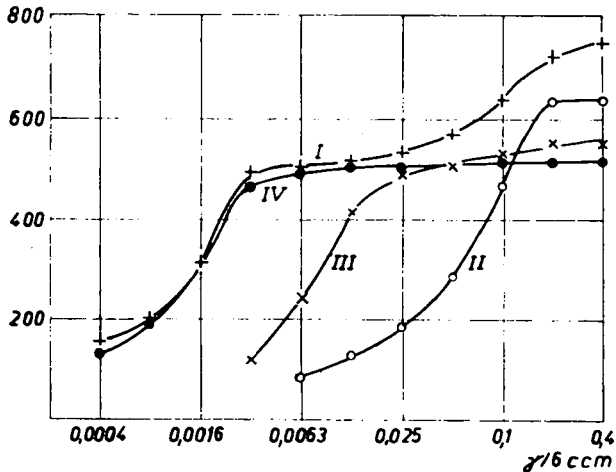
Tafel.

Substanz	Konzentrat. im Versuch (g/ccm)
Ammoniumacetat (Merck 1116) .....	$6.42 \times 10^{-3}$
Dinatriumphosphat ( $2H_2O$ , Merck 6580) .....	$1.25 \times 10^{-3}$
Monokaliumphosphat (nach Sørensen, Kahlbaum) .....	$0.83 \times 10^{-3}$
Magnesiumsulfat ( $7H_2O$ , Merck 5882) .....	$0.42 \times 10^{-3}$
Ferricitrat (Merck, DAB 6) .....	$4.20 \times 10^{-5}$
ManganII-chlorid ( $4H_2O$ , Merck 5926) .....	$1.25 \times 10^{-5}$
Glucose (Merck 8341) .....	$2.0 \times 10^{-2}$
<i>l</i> -Cysteinhydrochlorid (natürl., Hoffmann, La Roche) .....	$0.8 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Methionin (synth., Hoffmann, La Roche) .....	$0.5 \times 10^{-4}$
Glykokoll (synth., H. Stocker) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Alanin (synth., H. Stocker) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Valin (synth., H. Stocker) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Leucin (synth., H. Stocker) .....	$2.5 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Isoleucin (synth., H. Stocker) .....	$1.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Phenylalanin (synth., H. Stocker) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>l</i> -Tryptophan (natürl., Hoffmann, La Roche) .....	$1.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Asparaginsäure (synth., H. Stocker) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>l</i> -Glutaminsäure (natürl., Schuchardt) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
Aneurinchlorid-hydrochlorid (synth., I.-G. Elberfeld) .....	$1.0 \times 10^{-7}$
Aderminhydrochlorid (synth., I.-G. Elberfeld) .....	$2.0 \times 10^{-6}$
Nicotinsäure (aus Nicotin, Fraenkel & Landau) .....	$1.7 \times 10^{-5}$
Adeninsulfat (aus Hefe, Th. Wieland) .....	$4.3 \times 10^{-4} \frac{1}{2}$
Biotinmethylester krystall. (Kögl) <sup>5)</sup> .....	$2 \times 10^{-9}$
(+)-Pantothensaures Ba (synth., Th. Wieland) .....	$6 \times 10^{-6}$

Zum Test gibt man in eine Reihe von Röhrchen mit dieser Grundlösung das H'-Präparat in geometrisch ansteigender Konzentration, sterilisiert, beimpft und bebrütet im Brutschrank (s. Versuchsteil). Die nach 2-tägigem Wachstum erhaltenen Bakterienmengen, die als Trübung im lichtelektrischen Photometer von B. Lange gemessen werden, sind ein Maß für den H'-Gehalt des Präparates. Trägt man die erhaltenen Trübungswerte (Ordinate) gegen die Konzentration (Abszisse) auf, so erhält man Kurven, wie sie in Abbild. 1 wiedergegeben sind. Als Einheit (E) wurde die Menge H' definiert, welche in 1 ccm Test-Lösung gerade optimales Wachstum hervorruft.

<sup>5)</sup> Für größere Versuchsreihen diente ein H'-freies Biotin-Konzentrat aus Hefe (s. Versuchsteil).

Die als Beispiel abgebildeten Kurven zeigen die Austestung verschiedener Fraktionen, die durch Kohleadsorption, Nachwaschen mit Methanol und Elution mit 1-n. Ammoniak aus einem Hefekonzentrat hergestellt wurden<sup>6)</sup>. Man sieht, daß die überwiegende Menge des Wirkstoffes im Ammoniak-Eluat



Abbild. 1. Austestung einer Aufarbeitungsstufe (Kohleadsorption).  
Abszisse: Ausgangsmaterial in g (so daß die Ausbeute direkt abgelesen werden kann),  
Ordinate: Abgelesene Extinktionswerte am Lange-Photometer  $\times 1000$ . Kurve I:  
Ausgangskonzentrat, Kurve II: Kohle-Filtrat, Kurve III: Methanol-Vorelution,  
Kurve IV: Ammoniakalisches Eluat.

enthalten ist: Filtrat 30 E, Methanol 240 E, Ammoniak-Eluat 7700—15400 E. Das mit reinen H'-Präparaten in diesem Grundmedium erreichbare Wachstum liegt bei einem Trübungswert von  $\sim 500$ . Auch durch starke Überdosierung reiner H'-Präparate erhöht sich dieser Wert nicht weiter (Kurve II). Die durch unreine H'-Präparate erhaltenen höheren optimalen Werte (Kurven I und III) sind auf einen Gehalt an Faktor J zurückzuführen<sup>4)</sup>.

Nachdem gefunden war, daß der natürliche Wuchsstoff mit synthetischer *p*-Amino-benzoesäure identisch ist<sup>6)</sup>, war die Natur des letzten, für das *Streptobacterium plantarum* unbedingt nötigen Wuchsstoffes geklärt. Somit ist jetzt das Wachstum von *Streptobacterium plantarum* in einer Nährlösung möglich, die nur chemisch genau definierte, in kristallisierter Form bekannte Verbindungen enthält.

Die *p*-Amino-benzoesäure wirkt in einer Konzentration von  $1.6 \times 10^{-10}$  g/ccm bereits optimal und ist damit der wirksamste Bakterienwuchsstoff, der bisher bekannt ist (Biotin  $1 \times 10^{-9}$  g/ccm).

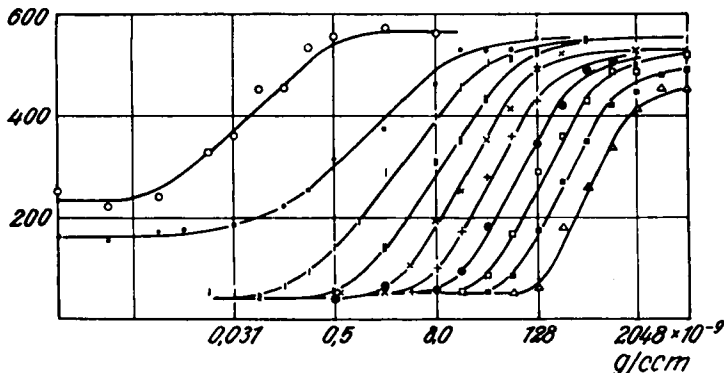
Da sich verschiedene Lokalanaesthetica von der *p*-Amino-benzoesäure ableiten, war es von Interesse, die Aktivität derartiger Substanzen mit derjenigen der *p*-Amino-benzoesäure zu vergleichen. *p*-Amino-benzoesäuremethylester, Novocain, Tutocain, sind etwa 2 Zehnerpotenzen weniger, Pantocain sogar noch weniger wirksam<sup>7)</sup>.

<sup>6)</sup> R. Kuhn u. K. Schwarz, B. 74, 1617 [1941].

<sup>7)</sup> Über die Konstitutions-Spezifität von Aminobenzoesäuren, von Aminobenzolsulfonsäuren und ähnlichen Verbindungen soll demnächst berichtet werden.

Nachdem schon D. D. Woods<sup>8)</sup> einen Antagonismus zwischen *p*-Amino-benzoesäure und den Sulfanilamiden an *Streptokokken* und *Coli*-Bakterien entdeckt hatte, schien es uns besonders wichtig, eine solche Wirkung auch bei *Streptobacterium plantarum* zu untersuchen: Mit Sulfanilsäure erreicht man eine völlige Hemmung des Wachstums bei einer Konzentration von 0.033%. Noch stärker hemmend wirken Sulfanilamid, Sulfapyridin, Sulfathiazol, Uliron, Neo-Uliron und Uliron C<sup>7)</sup>. Wesentlich schwächer als Sulfanilsäure hemmen *p*-Phenolsulfonsäure, Germanin, Atoxyl, Neostibosan, Salvarsan und Neosalvarsan.

Alle diese Hemmungen lassen sich durch Zugabe von *p*-Amino-benzoesäure aufheben. In Abbild. 2 ist als Beispiel die Aufhebung der Hemmung bei verschiedenen Sulfanilsäure-Konzentrationen dargestellt. Wie man sieht, ist in höheren Konzentrationsbereichen die Menge der für die Entthemung notwendigen *p*-Amino-benzoesäure direkt linear abhängig von der angewandten Sulfanilsäure-Konzentration. Das Verhältnis *p*-Amino-benzoesäure zu Sulfanilsäure hat bei halboptimalem Wachstum die konstante Größe von ~ 1:10000.



Abbild. 2. Entthemung durch *p*-Amino-benzoesäure bei steigender Sulfanilsäure-Konzentration.

Abszisse: *p*-Amino-benzoesäure in 10<sup>-9</sup> g/ccm.

Ordinate: Abgelesene Extinktionswerte am *L*<sub>ange</sub>-Photometer × 1000.

○—○	ohne Sulfanilsäure	
•—•	Sulfanilsäure (H <sub>2</sub> N.  .SO <sub>3</sub> H + H <sub>2</sub> O)	2.1 × 10 <sup>-8</sup> g/ccm
—	"	4.2 " "
!—!	"	8.4 " "
x—x	"	16.8 " "
+—+	"	33.6 " "
●—●	"	67.2 " "
□—□	"	134.4 " "
■—■	"	268.8 " "
△—△	"	537.6 " "

**Beschreibung der Versuche.**

a) Züchtung der Bakterien.

Der Stamm 10 S des *Streptobacterium plantarum* (Orla-Jensen) wird bei 28° laufend in Glucose-Mn-Bouillon gezüchtet. Die Überimpfung erfolgt

<sup>8)</sup> Brit. Journ. exp. Pathol. 21, 74 [1940].

jeden 2. Tag. Zur Vermeidung einer Übertragung von Wirkungssubstanz aus der meist an H'-reichen Glucose-Mn-Bouillon wird nicht direkt aus dieser in die Teströhrchen überimpft, sondern erst aus einer 1½-tägigen Zwischenkultur, die sich aus der in der Tafel angegebenen Grundlösung und einer unteroptimalen Menge H' zusammensetzt.

b) Ausführung des Testes.

Zur Ausführung des Testes wird die Grundlösung, die in einzelne Lösungen entsprechend hoher Konzentration unterteilt ist, in die Teströhrchen von etwa gleichem Durchmesser gegeben, die Lösung der zu prüfenden Präparate in solchen Mengen zugefügt, daß die Konzentration in einer Zweierpotenz-Reihe ansteigt, und schließlich mit Wasser auf 6 ccm aufgefüllt. Neuerdings verschließen wir die Röhrchen mit „Kapsenberg-Kappen“<sup>9)</sup>, die sich sehr bewährt haben. Nun wird im Dampftopf bei 100° ½ Stde. sterilisiert. Nach dem Erkalten (spätestens nach 24 Stdn.) folgt die Beimpfung aus 6 ccm der oben angegebenen 1½-tägigen Zwischenkultur, von der 1 Öse (Drahtstärke 0.5 mm, innerer Durchmesser 1.0 mm) in das Teströhrchen (6 ccm) übertragen wird.

Die sich sofort anschließende Bebrütung im Brutschrank wird seit einiger Zeit bei 28° (früher 25°<sup>2)</sup><sup>4)</sup>) ausgeführt, wodurch optimale Wachstumsgeschwindigkeit erzielt wird. 48 Stdn. nach der Beimpfung werden die Bakterienmengen nach mechanischem Aufschütteln durch Trübungsmessung im lichtelektrischen Photometer von B. Lange bestimmt. Abgelesen wird an der Extinktions-Skala, die Werte werden mit 1000 multipliziert.

c) Darstellung eines H'-freien Biotin-Konzentrates für den Test.

Ein Filtratfaktor-Präparat aus Hefe, welches sehr große Mengen Biotin und verhältnismäßig wenig H' enthielt, wurde bei p<sub>H</sub> 1 mit Äther im Extraktionsapparat extrahiert; das Biotin ging in den Ätherextrakt. Dieser wurde nach dem Eindampfen in 2-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelöst, filtriert und dann mit Phosphorwolframsäure erschöpfend gefällt. Die Hauptmenge des Biotins ging in die Fällung, welche mit BaCO<sub>3</sub> zerlegt wurde. Nach der Zerlegung wurde eingedampft und in absol. Alkohol gelöst. Diese Lösung wurde mit alkohol. Kupferacetat-Lösung erschöpfend gefällt, die Mutterlauge eingedampft, in H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit H<sub>2</sub>S zerlegt (in alkohol. Lösung bilden sich schlechtriachende Thioverbindungen). Die Fällung mit Kupferacetat aus alkohol. Lösung wird wiederholt. Dabei geht die Hauptmenge des Faktors H' in die Cu-Fällung, während die Hauptmenge des Biotins in Lösung bleibt. Das so erhaltene Präparat hat einen H'-Gehalt, der nur noch ungefähr 0.1% des Ausgangsmaterials entspricht. Die für den Test notwendige Menge Biotin ( $1 \times 10^{-9}$  g/ccm) ist in 1 γ Trockensubstanz enthalten.

Wir danken der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft für finanzielle Unterstützung, dem Werk Elberfeld der I. G. Farbenindustrie A.-G. für überlassene Präparate, sowie Fr. A. Leising und Hr. C. Breitwieser für die Hilfe bei der Ausführung der Versuche.

<sup>9)</sup> Schott u. Gen., Jena.