

Mikrobiologische Vitamin- und Aminosäurebestimmungen : Vorschläge der eidg. Lebensmittelbuch-Kommission

Autor(en): **Wiss, O.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **41 (1950)**

Heft 3-4

PDF erstellt am: **26.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983745>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN

Offizielles Organ der Schweiz. Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE

Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

ABONNEMENT: Schweiz Fr. 15.— per Jahrgang. Preis einzelner Hefte Fr. 2.75
Suisse fr. 15.— par année. Prix des fascicules fr. 2.75

BAND 41

1950

HEFT 3/4

Mikrobiologische Vitamin- und Aminosäurebestimmungen

Vorschläge der eidg. Lebensmittelbuch-Kommission, unterbreitet
von *O. Wiss*, Basel

(aus dem physiolog. chem. Institut der Universität Basel)

Allgemeines

Die Erforschung des Stoffwechsels der Mikroorganismen hat zur Entdeckung geführt, dass ihr Bedarf an Vitaminen in vielen Fällen weitgehend demjenigen des tierischen Organismus entspricht. So müssen vor allem die Vitamine des B-Komplexes in gleicher Weise dem Tiere und einer Reihe von Mikroorganismen zugeführt werden. Ähnlich liegen die Verhältnisse für die Aminosäuren. Es gibt Mikroorganismen, die wie der tierische Organismus nicht imstande sind, einzelne Aminosäuren selber zu bilden. Diese Erscheinung ermöglicht es, Vitamine und Aminosäuren auf mikrobiologischem Wege quantitativ zu bestimmen.

Zur einwandfreien Bestimmung müssen jedoch folgende Voraussetzungen erfüllt sein: Der verwendete Stamm muss so beschaffen sein, dass die Ansprüche auf die einzelnen Nährbodenbestandteile bei längerer Züchtung unverändert bleiben. Die Nährlösung muss alle für das Wachstum notwendigen Stoffe, mit Ausnahme des zu bestimmenden Vitamins oder der zu bestimmenden Amino-

säure, in optimaler Konzentration enthalten. In einem bestimmten Konzentrationsbereich muss Zusatz von steigenden Mengen des zu bestimmenden Vitamins oder der zu bestimmenden Aminosäure einen gut abgestuften Wachstumseffekt hervorrufen, so dass die Ermittlung einer Standardkurve möglich ist.

Diese Voraussetzungen sind weitgehend verwirklicht bei vielen Milchsäurebakterienstämmen und bei einigen Pilzen, wie *Phycomyces blakesleeana* und *Neurospora*-Arten. Durch Auswahl geeigneter Stämme und Mutanten ist es gelungen, für jedes Vitamin des B-Komplexes und für den Grossteil der Aminosäuren Bestimmungsmethoden auszuarbeiten.

Prinzip der Methoden

Die Durchführung der Bestimmungen ist in allen Fällen prinzipiell gleich. Einer Reihe von Versuchsansätzen, welche dieselbe Menge *Nährlösung* (2—5 cm³) enthalten, werden abgestufte Mengen des zu bestimmenden Vitamins bzw. der zu bestimmenden Aminosäure zugesetzt. (*Standardwerte*). Es empfiehlt sich, pro Standarddosis mindestens 3 Vergleichsansätze einzusetzen. Weitere Ansätze erhalten an Stelle der bekannten Vitamin- oder Aminosäurelösung die zu bestimmende Substanz. Es werden 3 verschiedene Konzentrationen gewählt, die so beschaffen sein sollen, dass sie innerhalb der Standardwerte liegen. Auch hier sollen für eine Konzentration mindestens 3 Vergleichsansätze vorgesehen werden. Die Ansätze werden alle in gleicher Weise geimpft und bebrütet. Zur Impfung verwendet man eine aus einer *Dauerkultur* hergestellte *Impflösung*. Nach Ablauf einer ein- bis mehrtägigen Wachstumsperiode wird, wenn es sich um Bakterien handelt, entweder der Milchsäuregehalt titrimetrisch bestimmt oder der Trübungswert der Bakteriensuspension gemessen; wenn Pilze zur Bestimmung verwendet wurden, ermittelt man das Trockengewicht des Myceliums. Der Vergleich der Wachstumswirkung, bedingt durch bekannte Vitamin- oder Aminosäuredosen einerseits und durch die zu bestimmende Substanz andererseits, ermöglicht eine quantitative Auswertung.

Vitaminbestimmungen

Bestimmung des Lactoflavins (Vitamin B₂)

Methode nach *Snell* und *Strong*¹⁾ mit *Lactobacillus casei* ϵ ²⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Schrägagar von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

1,5 % Hefeextrakt (Difco)

0,5 % Glucose

1,5 % Agar

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur 24 Stunden bei 37° C gehalten, anschliessend bei 4° C aufbewahrt.

Nährlösung: Zur Bereitung der Nährlösung sind folgende Stammlösungen herzustellen:

1. *Peptonlösung:* 20 g Pepton (Difco) werden in 125 cm³ Wasser gelöst und mit 125 cm³ 8 %iger Natronlauge verdünnt. Zur Zerstörung des eventuell vorhandenen B₂-Gehaltes wird die Mischung tagsüber während ca. 12 Stunden dem Tageslicht ausgesetzt und anschliessend über Nacht mindestens 12 Stunden in einem Abstand von 50 cm mit einer 100-Watt-Lampe, d.h. während total 24 Stunden, belichtet. Dann wird die Lösung mit Eisessig neutralisiert (dazu sind ca. 14 cm³ notwendig) und mit 5,8 g wasserhaltigem Natriumacetat versetzt. Das Volumen der Lösung wird mit Wasser auf 400 cm³ ergänzt. Die Haltbarkeit beträgt unter dünner Toluolschicht im Eisschrank ca. 14 Tage. Sollte sich die Lösung vor Ablauf dieser Zeit trüben, so ist sie nicht mehr brauchbar.
2. *Hefeauszug:* 50 g Hefeextrakt (Difco) werden in 250 cm³ Wasser gelöst und mit 250 cm³ einer 30 %igen basischen Bleiacetatlösung versetzt. Durch Zusatz von konz. Ammoniak wird die Lösung bis auf ca. pH = 10 alkaliisiert. Vom dadurch entstehenden Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat durch Zusatz von Eisessig angesäuert (Lackmus). Die Lösung wird zur Ausfällung des Bleis mit Schwefelwasserstoff durchströmt. Nach Entfernung des Bleisulfidniederschlages mit Wasser auf 500 cm³ ergänzen. Haltbarkeit im Eisschrank unter Toluol: 3 Monate.
3. *l-Cystinlösung:* 2 g l-Cystin werden in ca. 50 cm³ Wasser suspendiert und gekocht. Durch Zusatz von 2,5 cm³ konz. Salzsäure und durch längeres Erhitzen geht das Cystin in Lösung. Das Volumen wird auf 500 cm³ mit Wasser ergänzt. Haltbarkeit unter Toluol bei Zimmertemperatur: einige Monate.
4. *dl-Tryptophanlösung:* 2 g dl-Tryptophan werden in ca. 50 cm³ Wasser zum Sieden erhitzt und tropfenweise bis zur vollständigen Lösung mit konz. Salzsäure versetzt. Mit Wasser auf 500 cm³ ergänzen. Haltbarkeit unter Toluol im Eisschrank: mehrere Monate.
5. *Adenin + Guanin + Uracillösung:* Je 50 mg Adenin, Guanin und Uracil werden in 50 cm³ Wasser suspendiert und nach Zusatz von 15 bis 20 Tropfen konz. Salzsäure bis zur vollständigen Lösung auf dem siedenden Wasserbad gehalten. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird das Volumen mit Wasser auf 50 cm³ ergänzt. Haltbarkeit im Eisschrank unter Toluol: 14 Tage.
6. *Xanthinlösung:* 50 mg Xanthin werden in 50 cm³ Wasser suspendiert, ca. 15 Tropfen konz. Ammoniak zugegeben und bis zur vollständigen Lösung auf dem siedenden Wasserbad gehalten. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird das Volumen mit Wasser auf 50 cm³ ergänzt. Haltbarkeit unter Toluol im Eisschrank: 14 Tage.

7. *Calcium-pantothenat, Pyridoxin (B₆), Nicotinsäure (PP)*: Je 10 mg Calcium-pantothenat, Pyridoxin und Nicotinsäure werden in je 100 cm³ Wasser gelöst. Haltbarkeit unter Toluol im Eisschrank: 8 Tage.
8. *p-Aminobenzoesäurelösung*: 10 mg p-Aminobenzoesäure werden in 100 cm³ Wasser suspendiert und zur vollständigen Lösung 3—4 Tropfen Eisessig zugegeben. Haltbarkeit unter Toluol im Eisschrank: 8 Tage.
9. *Salzlösung A*: 25 g KH₂PO₄ und 25 g K₂HPO₄ werden in 250 cm³ Wasser gelöst. Haltbarkeit im Eisschrank unbeschränkt.
10. *Salzlösung B*: 10 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,5 g NaCl, 0,5 g FeSO₄ · 7 H₂O und 0,5 g MnSO₄ · 4 H₂O werden in 250 cm³ Wasser gelöst. Um ein Ausfallen von Salzen zu verhindern, werden 5 Tropfen konz. Salzsäure zugegeben. Haltbarkeit im Eisschrank unbeschränkt.

Bereitung der Nährlösung:

Glucose	20 g
Xylose	1 g
Natriumchlorid	5 g
Ammoniumsulfat	3 g
Peptonlösung	100 cm ³
l-Cystinlösung	25 cm ³
dl-Tryptophanlösung	25 cm ³
Hefeauszug	20 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	10 cm ³
Xanthinlösung	10 cm ³
Ca-pantothenatlösung	1 cm ³
Nicotinsäurelösung	1 cm ³
Pyridoxinlösung	1 cm ³
p-Aminobenzoesäurelösung	4 cm ³
Salzlösung A	5 cm ³
Salzlösung B	5 cm ³

werden im Messkolben mit Wasser auf 500 cm³ ergänzt. Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und mit 40 %iger Natronlauge auf pH = 6,8 eingestellt *).

B₂-Standardlösung: Es werden genau 25 mg Lactoflavin eingewogen, im Litermesskolben in wenig Wasser suspendiert, mit 1 cm³ Eisessig versetzt und auf 1000 cm³ mit Wasser aufgefüllt. Diese Stammlösung wird unter Toluol im Eisschrank im Dunkeln aufbewahrt und ist 14 Tage haltbar. Zur Bereitung der Standardlösung wird 1 cm³ der Stammlösung auf 250 cm³ mit Wasser verdünnt, so dass 1 cm³ 0,1 γ B₂ enthält.

*) Für die Bereitung der Dauerkultur, Impflösung und Nährlösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

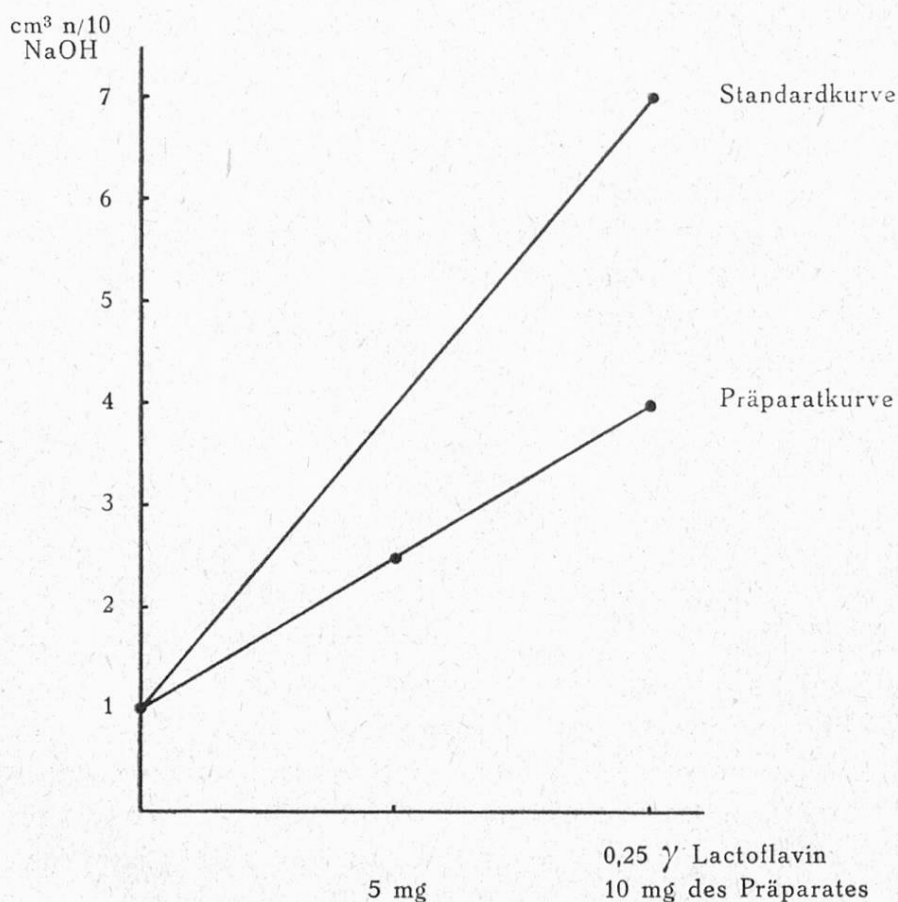
Impflösung: In 2 Zentrifugengläser von 15 bis 20 cm³ Inhalt werden 5 cm³ Nährlösung, 2,5 cm³ Standardlösung und 2,5 cm³ Wasser gegeben. Die Zentrifugengläser werden mit Wattepfropfen verschlossen und während 10 Minuten bei 115° C sterilisiert. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur werden die Ansätze mit Impfgut der Dauerkultur beimpft und während 18—20 Stunden bei 37° C gehalten. Durch 10 Minuten langes Zentrifugieren bei ca. 3000 Touren werden die Bakterien abgetrennt; die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und durch 10 cm³ sterile physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Die homogene Suspension wird bis auf ca. 1 cm³ verworfen und der Rest durch Zusatz von ca. 15 cm³ Kochsalzlösung verdünnt.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Es ist zu berücksichtigen, dass Stärke und freie Fettsäuren ein zusätzliches Wachstum verursachen können. Die freien Fettsäuren werden durch 10stündige Extraktion mit Petroläther (Sdp. 40—60° C) im Soxhlet entfernt; die Stärke wird durch Hydrolyse aufgeschlossen, indem das zu bestimmende Material in 0,1n-Salzsäure während 15 Minuten bei 120° C im Autoklaven gehalten wird. Nach Zusatz von ca. 0,7 g Natriumacetat wird mit Natronlauge bis pH = 4,5 neutralisiert, vom Ungelösten abfiltriert, ein aliquoter Teil auf pH = 6,8 eingestellt und so verdünnt, dass pro cm³ ca. 0,05 γ B₂ enthalten sind.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefässe dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. In je 3 Röhren werden 0,5 cm³ (0,05 γ), 1,0 cm³ (0,1 γ), 1,5 cm³ (0,15 γ), 2,0 cm³ (0,2 γ) und 2,5 cm³ (0,25 γ) der Standardlösung eingefüllt. Je 3 weitere Gläser erhalten 2,0, 3,0 und 4,0 cm³ des zu untersuchenden Extraktes. Dann werden alle Ansätze mit Wasser auf 5 cm³ aufgefüllt, 3 weitere Röhren dienen als Leerwerte und erhalten ausschliesslich 5 cm³ Wasser. Durch Zusatz von je 5 cm³ Nährlösung wird das Gesamtvolumen aller Ansätze auf 10 cm³ ergänzt. Die Röhren werden, nachdem sie mit Wattepfropfen verschlossen worden sind, zur Sterilisierung während 10 Minuten im Autoklaven bei 115° C gehalten. Nachdem auf Zimmertemperatur abgekühlt worden ist, werden die Ansätze durch Zugabe von je 1 Tropfen der oben beschriebenen frisch bereiteten Impflösung geimpft. Die Röhren werden während 3 Tagen bei 37° C im Brutschrank gehalten. Anschliessend wird durch einfache Titration mit n/10 Natronlauge und Bromthymolblau als Indikator der Milchsäuregehalt bestimmt.

Auswertung: Die Titrationswerte der Standardansätze werden in einem Koordinatensystem mit den Standardwerten in Beziehung gesetzt, wobei auf der Abszisse die Standarddosen, auf der Ordinate die verbrauchten cm³ Natronlauge aufgetragen werden. Es ist zu unterscheiden zwischen einem linearen und einem gebogenen Verlauf der Standardkurve. Wenn die Kurve gebogen verläuft, wird der Gehalt der 3 Extrakt Dosen durch einfaches Ablesen aus

der Standardkurve ermittelt und daraus der Mittelwert errechnet. Die einzelnen Werte sollten nicht mehr als $\pm 10\%$ voneinander abweichen. Eine lineare Kurve, oder zumindest eine Kurve, die im Bereich der Extrakt-dosen linear verläuft, wie sie sich im allgemeinen beim B₂-Versuch ergibt, ermöglicht eine genauere Auswertung. Der linear verlaufende Teil von Standard- und Extraktkurve wird bis zur Ordinate verlängert und der Schnittpunkt ermittelt. Gemeinsamer Schnittpunkt oder eine nur geringe Abweichung verspricht ein genaues Resultat. Die weitere Auswertung soll mit folgendem Beispiel illustriert werden:



Figur 1

Schnittpunkt der Standardkurve bei $1,0 \text{ cm}^3 \text{ n/10 NaOH}$. Die grösste Standarddosis von $0,25 \gamma$ verbraucht durchschnittlich $7,0 \text{ cm}^3 \text{ n/10 NaOH}$. $7,0 - 1,0$ ergibt diejenige Laugemenge, die $0,25 \gamma$ entspricht. 1γ ist somit $24 \text{ cm}^3 \text{ n/10 NaOH}$ gleichzusetzen.

Die kleine Extrakt-dose, die 5 mg des untersuchten Ausgangsmaterials enthält, verbraucht $2,5 \text{ cm}^3 \text{ n/10 NaOH}$, die grosse Extrakt-dose, die 10 mg enthält, verbraucht $4,0 \text{ cm}^3 \text{ n/10 NaOH}$. Demnach entsprechen 5 mg ($10 - 5$) einer Laugemenge von $1,5 \text{ cm}^3$, 1 g demnach 300 cm^3 .

Resultat: $300 \text{ cm}^3 : 24 \text{ cm}^3 = 12,5 \gamma \text{ B}_2 \text{ pro g}$ des untersuchten Materials.

Bestimmung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid
Methode nach *Snell* und *Wright* ³⁾ mit *Lactobacillus arabinosus* 17/5 ⁴⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Schrägagar von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

1,0 ‰	Glucose
1,0 ‰	Hefeextrakt (Difco)
1,5 ‰	Agar

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur 24 Stunden bei 37° C gehalten, anschliessend bei 4° C aufbewahrt.

Nährlösung: Ausser den bei der Lactoflavinbestimmung angeführten Stamm-
lösungen werden noch folgende benötigt:

1. *Vitaminfreies Casein-Hydrolysat*: Vor der Hydrolyse ist vitaminfreies Casein ^{*}) noch weiter zu reinigen. 100 g vitaminfreies Casein werden 2 mal während 1 Stunde mit je 300 cm³ 85 ‰igem Äthanol geschüttelt und durch Filtration davon befreit. Zum Rückstand werden 500 cm³ 85 ‰iges Äthanol zugegeben, über Nacht stehen gelassen und filtriert, anschliessend wird der Rückstand mit Wasser von 50° C gut gewaschen. Die Hydrolyse erfolgt mit 500 cm³ 25 ‰iger Schwefelsäure durch Erhitzen im Autoklaven während 10 Stunden bei 120° C oder durch 16—20 Stunden langes Erhitzen am Rückfluss. Nach Zugabe von 200 g Bleioxyd (PbO) wird vom entstandenen Bleisulfat abfiltriert; im Filtrat wird die restliche Schwefelsäure durch Zusatz von Bariumhydroxyd ausgefällt und durch Filtration entfernt. Durch Zusatz von Schwefelsäure wird das Hydrolysat auf pH = 3 gebracht, 20 Minuten mit 20 g aktiver Holzkohle geschüttelt, anschliessend filtriert, die Schwefelsäure mit Bariumhydroxyd gefällt und durch Filtration entfernt. Die Lösung wird so eingestellt, dass in 1 cm³ 100 mg Substanz enthalten sind. Sie wird unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt.
2. *B₁-Lösung*: 10 mg Aneurin werden in wenig Wasser gelöst und das Volumen mit 0,2 ‰iger Salzsäure auf 100 cm³ ergänzt. Haltbarkeit im Eisschrank: einige Wochen.
3. *Biotinlösung*: Der Inhalt einer Ampulle (25 γ Biotin ^{**}) wird mit 1 cm³ Salzlösung A (vgl. S. 228) versetzt und auf 250 cm³ mit Wasser verdünnt. Haltbarkeit im Eisschrank unter Toluol: ca. 3 Monate.

500 cm³ Nährlösung enthalten:

Glucose	20 g
Natriumacetat (wasserhaltig)	33 g

^{*}) Bezogen von der Firma Dr. A. Wander, Bern.

^{**}) Bezogen von der Firma F. Hoffmann-La Roche, Basel.

Xylose		1 g
Natriumchlorid		5 g
Ammoniumsulfat		3 g
Vitaminfreies Casein-Hydrolysat		100 cm ³
l-Cystinlösung	vgl. S. 227	50 cm ³
dl-Tryptophanlösung	vgl. S. 227	50 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Xanthinlösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Aneurinlösung		1 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Pyridoxinlösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	8 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Biotinlösung		4 cm ³
Salzlösung A	vgl. S. 228	5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und mit 40 %iger Natronlauge auf pH = 6,8 eingestellt *).

Nicotinsäurestandardlösung: 10 mg Nicotinsäure werden in 100 cm³ Wasser gelöst. 1 cm³ dieser Lösung wird mit Wasser auf 1000 cm³ verdünnt, so dass in 1 cm³ 0,1 γ Nicotinsäure enthalten sind.

Impflösung: Als Impflösung dient Nicotinsäurenährlösung, welcher pro cm³ 0,2 γ Nicotinsäure zugesetzt worden sind. Die Bereitung erfolgt wie unter B₂-Bestimmung beschrieben (vgl. S. 229). Nach erfolgter Bebrütung von 18 bis 20 Stunden bei 37° C wird zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und durch sterile physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Es wird wiederum zentrifugiert, abgegossen und mit 10 cm³ Kochsalzlösung aufgefüllt. 1 cm³ der Suspension wird mit Kochsalzlösung auf ca. 100 cm³ verdünnt.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Da Stärke die Bestimmung stört, wird der Extrakt bereitet, wie unter B₂-Bestimmung angegeben (vgl. S. 229).

Durchführung der Bestimmungen: Vgl. B₂-Versuch (Seite 229). Standardansätze: 0,5 cm³ (0,05 γ), 1,0 cm³ (0,1 γ), 1,5 cm³ (0,15 γ), 2,0 cm³ (0,2 γ), 2,5 cm³ (0,25 γ) und 3,0 cm³ (0,3 γ) der Nicotinsäurestandardlösung. Extrakt Dosen: 2,0, 3,0 und 4,0 cm³ des zu untersuchenden Extraktes. Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 5 cm³ Wasser.

Auswertung: Vgl. Vitamin B₂-Bestimmung (Seite 229).

*) Für die Bereitung der Dauerkultur, Impflösung und Nährlösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

Bestimmung des Aneurins (Vitamin B₁)

Methode nach *Sarett* und *Cheldelin*⁵⁾ mit *Lactobacillus fermentum* 36⁶⁾

Dauerkultur: Die Bereitung des Nährbodens, Überimpfung und Bebrütung erfolgt wie für die Nicotinsäurebestimmung beschrieben (Seite 231).

Nährlösung: Ausser den schon beschriebenen Stammlösungen wird noch eine *Folsäurelösung* benötigt, welche folgendermassen bereitet wird: 1 mg synthetische Folsäure wird in 250 cm³ Wasser gelöst und mit 90 %igem Äthanol auf 500 cm³ verdünnt. Diese Stammlösung wird für den B₁-Versuch 1 : 5 verdünnt. Haltbarkeit im Eisschrank: ca. 3 Monate.

500 cm³ Nährlösung enthalten:

Glucose		20 g
Natriumacetat (wasserhaltig)		10 g
Natriumchlorid		5 g
Peptonlösung	vgl. S. 227	200 cm ³
Casein-Hydrolysat	vgl. S. 231	25 cm ³
l-Cystinlösung	vgl. S. 227	25 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	4 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Pyridoxinlösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Biotinlösung	vgl. S. 231	4 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Folsäurelösung		0,5 cm ³
Salzlösung A	vgl. S. 228	5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und mit 40 %iger Natronlauge auf pH = 6,5 eingestellt *).

Aneurinstandardlösung: 10 mg Aneurin werden in 100 cm³ Wasser gelöst. 1 cm³ dieser Lösung wird mit Wasser auf 100 cm³ verdünnt, 1 cm³ dieser verdünnten Lösung wiederum auf 200 cm³ verdünnt, so dass 1 cm³ 0,005 γ B₁ enthält.

Impflösung: Zur Bereitung der Impflösung wird B₁-Nährlösung verwendet. Pro 5 cm³ werden 0,05 γ B₁ zugegeben und auf das doppelte Volumen mit Wasser ergänzt. Die Sterilisation der Ansätze erfolgt im strömenden Dampf (bei höherer Temperatur wird das Aneurin zersetzt). Nach Bebrütung während 18 Stunden bei 37° C wird zentrifugiert und 2 mal mit physiologischer Koch-

*) Für die Bereitung der Dauerkultur, Impflösung und Nährlösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

salzlösung ausgewaschen (vgl. Nicotinsäureversuch Seite 232), schliesslich in 10 cm³ physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und 1 cm³ dieser Suspension auf ca. 20 cm³ mit Kochsalzlösung verdünnt.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Zur Freisetzung des gebundenen Aneurins wird 1 g des zerkleinerten Materials in 40 cm³ 0,5-%igem Acetatpuffer von pH = 4,5 aufgenommen, mit je 20 mg Papain und Taka-Diastase versetzt und während 24 Stunden bei 37° C unter Toluol gehalten. Zur Inaktivierung der zugesetzten Enzyme wird der Extrakt anschliessend während 30 Minuten dem strömenden Dampf ausgesetzt, dann auf pH = 6,5—6,6 eingestellt und so verdünnt, dass pro cm³ ca. 0,005—0,01 γ Aneurin enthalten sind.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefässe dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen der Ansätze beträgt 10 cm³, das heisst 5 cm³ Nährlösung werden nach Zusatz des Standards bzw. des Extraktes auf 10 cm³ mit Wasser ergänzt. Standarddosen: 0,5 cm³ (0,0025 γ), 1,0 cm³ (0,005 γ), 1,5 cm³ (0,0075 γ), 2,0 cm³ (0,01 γ), 3,0 cm³ (0,015 γ), 4,0 cm³ (0,02 γ) und 5,0 cm³ (0,025 γ) der Standardlösung. Extrakt Dosen: 2,5, 3,5 und 5,0 cm³. Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 5 cm³ Wasser. Wenn der zu untersuchende Extrakt gefärbt oder trüb ist, werden gleich bereitete Vergleichsansätze mitgeführt, die jedoch nicht geimpft werden (starke Färbung oder Trübung verunmöglicht die Bestimmung). Die Ansätze werden während 15 Minuten im strömenden Dampf sterilisiert. Die Bebrütungszeit bei 37° C beträgt nur 16—18 Stunden (bei längerer Dauer der Bebrütung gleichen sich die Wachstumsunterschiede aus). Anschliessend werden die Röhren während 30 Minuten im Eisschrank gehalten, um weiteres Wachstum der Bakterien zu verunmöglichen. Zur Bestimmung der Wachstumswirkung wird der Trübungswert der einzelnen Ansätze bei einer Wellenlänge von 430 m μ und 1 cm Schichtdicke ermittelt und eventuell mit dem Wert der ungeimpften Vergleichsansätze korrigiert.

Auswertung: In einem Koordinatensystem werden auf der Abszisse die Standarddosen, auf der Ordinate die zugehörigen Extinktionswerte aufgetragen. Aus der so erstellten Standardkurve wird für jede Extrakt Dose der Gehalt ermittelt und der Durchschnittswert errechnet.

Bestimmung des Aneurins mit *Phycomyces blakesleeanus* ⁷⁾ nach *Schopfer* (Mikromethode) ⁸⁾

Dauerkultur: Der Pilz wird in 100-cm³-Erlenmeyerkolben, welche ca. 10 cm³ eines Nährbodens folgender Zusammensetzung enthalten, gezüchtet:

Glucose	3,0 ‰
Asparagin	1,0 ‰
KH ₂ PO ₄	1,5 ‰
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 ‰
Agar	3,0 ‰
Trockenhefe	3,0 ‰

Die Kulturen sind ca. 3 Monate haltbar. Zur Überimpfung wird der Thallus mit steriler Nadel vom Nährboden vorsichtig gelöst, ohne dass Teile vom Nährboden mitgerissen werden, und in 50 cm³ sterilem Wasser geschwenkt. Von der so erhaltenen Sporensuspension werden einige Tropfen zur Überimpfung verwendet. Die Kulturen werden bei Zimmertemperatur (18—20° C) im Dunkeln gehalten.

Nährlösung: 250 cm³ Nährlösung enthalten:

Glucose		15 g
Asparagin		0,5 g
KH ₂ PO ₄		0,75 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O		0,25 g
Hypoxanthin		0,25 mg
Vitamin Free Casamino Acids (Difco) *)		7,5 g
l-Cystinlösung *)	vgl. S. 227	25 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung *)	vgl. S. 227	10 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung) *)	vgl. S. 228	4 cm ³
Ca-pantothenatlösung *)	vgl. S. 228	1 cm ³
Pyridoxinlösung *)	vgl. S. 228	1 cm ³
Nicotinsäurelösung *)	vgl. S. 228	1 cm ³
Biotinlösung *)	vgl. S. 231	4 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung *)	vgl. S. 228	1 cm ³
Folsäurelösung 1 : 5 verdünnt *)	vgl. S. 233	0,5 cm ³
Salzlösung A *)	vgl. S. 228	5 cm ³
Salzlösung B *)	vgl. S. 228	5 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt und filtriert.

Impflösung: Von ca. 14 Tage alten Kulturen wird wie oben beschrieben der Thallus losgelöst, in ca. 50 cm³ Wasser geschwenkt und die so erhaltene Sporensuspension verwendet. Sie ist im Eisschrank ca. 24 Stunden haltbar.

*) Es hat sich gezeigt, dass bei der Analyse kompliziert zusammengesetzter Präparate offenbar durch die Wirkung anderer, in der Nährlösung nicht enthaltener Wachstumsfaktoren ein Wachstumseffekt zustande kommt, der denjenigen der optimal wirkenden Standardwerte übertrifft, wenn der von *Schopfer* angegebene Nährboden verwendet wird. Zur Vervollständigung der Nährlösung wird auf Grund noch nicht publizierter Untersuchungen eine Mischung von freien Aminosäuren (in Form der Vitamin Free Casamino Acids), Vitaminen und weiteren Salzen zugesetzt.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Vgl. B₁-Bestimmung nach Sarett und Cheldelin (Seite 234). In 1 cm³ des Extraktes soll jedoch ca. 0,1 γ B₁ enthalten sein.

Durchführung der Bestimmungen: In Reagenzgläser von ca. 3 cm Durchmesser und 18 cm Länge werden 2,5 cm³ Nährlösung eingefüllt. Nach Zugabe der Standarddosen von 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 und 0,3 γ B₁ bzw. der Extrakt-dosen von 0,5, 1,0, 2,0 und 2,5 cm³ werden alle Ansätze inkl. Leerwert auf 5 cm³ mit Wasser ergänzt. Zur Sterilisierung werden die Ansätze 13 Minuten bei 115⁰ C gehalten. Dabei erfolgt eine teilweise Spaltung des Aneurins in Pyrimidin- und Thiazolanteil. Die Bestimmung wird im Gegensatz zur Lacto-bacillusmethode dadurch nicht beeinflusst, weil die Komponenten gleiche Wachstumswirkung besitzen wie das intakte Molekül. Die Ansätze werden mit 1 Tropfen der Impflösung versetzt und 8 Tage bei 18—20⁰ C gehalten. Dann wird das Mycel durch Abnutschen von der Nährlösung abgetrennt, mit Wasser ausgewaschen, ca. 2 Stunden bei 120⁰ C getrocknet und das Trockengewicht ermittelt.

Auswertung: Standarddosen und Trockengewichte werden im Koordinatensystem miteinander in Beziehung gebracht und aus der Kurve der Gehalt der einzelnen Extrakt-dosen ermittelt.

Bestimmung des Pyridoxins (Vitamin B₆)

Methode nach Stokes und Mitarbeitern⁹⁾ mit *Neurospora sitophila* 299¹⁰⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Schrägagar von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

3,8 %	Maltose
0,8 %	Bacto-Pepton (Difco)
0,2 %	Bacto-Malzextrakt (Difco)
2,0 %	Agar

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur während 5 Tagen bei 30⁰ C gehalten, anschliessend bei 4⁰ C aufbewahrt.

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Saccharose	15,0 g
Ammoniumtartrat	5,0 g
Natriumcitrat	4,0 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g

FeCl ₃		5,0 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O		2,0 mg
Biotinlösung	vgl. S. 231	40,0 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 4,6 eingestellt *).

Pyridoxinstandardlösung: 10 mg Pyridoxin werden in 100 cm³ Wasser gelöst. 1 cm³ dieser Lösung wird mit Wasser auf 500 cm³ verdünnt, so dass 1 cm³ 0,2 γ B₆ enthält.

Impflösung: Zur Bereitung der Impflösung wird mit einer Platinoese eine kleine Menge Sporen von einer 48stündigen Dauerkultur entnommen und in 10 cm³ 0,9 %iger steriler Kochsalzlösung suspendiert.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: 2—10 g des zerkleinerten Materials werden in 50 cm³ n-Salzsäure suspendiert und zur Hydrolyse des gebundenen Pyridoxins während 1 Stunde bei 120° C im Autoklaven gehalten. Dann wird heiss filtriert, mit wenig Wasser nachgewaschen und mit Wasser so verdünnt, dass 1 cm³ ca. 0,2 γ B₆ enthält.

Es ist zu berücksichtigen, dass Aneurin die Bestimmung stört. Eventuell vorhandenes Vitamin B₁ wird deshalb durch Natriumsulfit nach folgender Vorschrift zerstört: 20 cm³ des oben beschriebenen unverdünnten Extraktes werden mit 0,7 cm³ 10 n-Natronlauge und 5 cm³ einer frisch bereiteten 1 %igen Natriumsulfitlösung versetzt; das pH wird mit n-Natronlauge auf 8 eingestellt (Kresolrot als Indikator) und die Lösung während 30 Minuten im strömenden Dampf gehalten. Nach Abkühlen wird der Extrakt zur Zerstörung des Natriumsulfits tropfenweise mit einer frisch bereiteten 2 %igen Wasserstoffperoxydlösung versetzt. Es ist darauf zu achten, dass das gesamte Sulfit zerstört wird, da auch die kleinste Menge ein normales Wachstum des Pilzes verunmöglicht. Wasserstoffperoxyd wird deshalb bis zu einem geringen Überschuss zugegeben. Dieser wird folgendermassen festgestellt: Zu einer Mischung von 1 Tropfen 50 %iger Schwefelsäure, 1 Tropfen 10 %iger Kaliumjodidlösung und 1 Tropfen 1 %ige lösliche Stärkelösung wird 1 Tropfen des zu prüfenden Extraktes zugegeben. Bleibende purpurrote Färbung lässt erkennen, dass ein Überschuss von Wasserstoffperoxyd vorliegt. Die Lösung wird mit n-Salzsäure auf pH = 4,6 eingestellt und mit Wasser so verdünnt, dass 1 cm³ ca. 0,2 γ B₆ enthält.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefässe dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen der Ansätze beträgt 10 cm³, das heisst 5 cm³ Nährlösung werden nach Zusatz des Standards bzw. des Extraktes auf 10 cm³ mit Wasser

*) Für die Bereitung der Dauerkultur und Nährlösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

ergänzt. Standarddosen: 0,5 cm³ (0,1 γ), 1,0 cm³ (0,2 γ), 2,0 cm³ (0,4 γ), 3,0 cm³ (0,6 γ), 4,0 cm³ (0,8 γ) und 5,0 cm³ (1,0 γ) der Standardlösung. Extrakt Dosen: 1,0, 2,0 und 4,0 cm³. Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 5 cm³ Wasser. Die Ansätze werden während 15 Minuten bei 115° C sterilisiert und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur mit je 1 Tropfen der Impflösung geimpft. Nach 5tägiger Bebrütung bei 30° C werden die Röhren zur Hemmung des Wachstums während 5 Minuten im strömenden Dampf gehalten. Dann wird das Mycel durch Abnutschen von der Nährlösung befreit, mit Wasser ausgewaschen, zwischen Filtrierpapier leicht gepresst, während 2 Stunden bei 100° C getrocknet und das Trockengewicht ermittelt.

Auswertung: Standarddosen und Trockengewichte werden im Koordinatensystem miteinander in Beziehung gebracht. Vgl. B₂-Bestimmung (Seite 229).

Bestimmung von Pantothenensäure

Methode nach Skeggs und Wright¹¹⁾ mit *Lactobacillus arabinosus* 17/5¹²⁾

Dauerkultur: Die Bereitung des Nährbodens, Überimpfung und Bebrütung erfolgt wie für die Nicotinsäurebestimmung beschrieben (Seite 231).

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Vitaminfreies Casein (Vitamin Free Casamino Acids, Difco)		6,0 g
Glucose		20,0 g
Natriumacetat		10,0 g
l-Cystinlösung	vgl. S. 227	25,0 cm ³
dl-Tryptophanlösung	vgl. S. 227	25,0 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10,0 cm ³
Aneurinlösung	vgl. S. 231	10,0 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	40,0 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	10,0 cm ³
Pyridoxinlösung	vgl. S. 228	20,0 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung	vgl. S. 228	1,0 cm ³
Biotinlösung	vgl. S. 231	4,0 cm ³
Salzlösung A	vgl. S. 228	5,0 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5,0 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und mit 40 %iger Natronlauge auf pH = 6,8 eingestellt *).

Pantothensäurestandardlösung: 10 mg Ca-pantothenat werden in 200 cm³ Wasser gelöst, 1 cm³ dieser Lösung wird mit Wasser auf 1000 cm³ verdünnt, so dass 1 cm³ 0,05 γ Ca-pantothenat enthält.

*) Für die Bereitung der Dauerkultur, Impflösung und Nährlösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

Impflösung: Als Impflösung dient Pantothenensäurenährlösung, welcher pro cm^3 0,2 γ Pantothenensäure zugesetzt worden sind. Die Bereitung erfolgt wie unter B₂-Bestimmung beschrieben (vgl. Seite 229). Nach erfolgter Bebrütung von 18 bis 20 Stunden bei 37° C wird zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgossen und durch sterile physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Es wird wiederum zentrifugiert, abgossen und mit 10 cm^3 Kochsalzlösung aufgefüllt. 1 cm^3 der Suspension wird mit Kochsalzlösung auf ca. 100 cm^3 verdünnt.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: 1 g des zerkleinerten Materials wird in 40 cm^3 0,5 %igem Acetatpuffer von pH = 4,5 aufgenommen, mit je 20 mg Papain und Taka-Diastase versetzt und während 24 Stunden bei 37° C unter Toluol gehalten. Zur Inaktivierung der zugesetzten Enzyme wird der Extrakt anschliessend während 30 Minuten dem strömenden Dampf ausgesetzt, dann abgekühlt, auf 50 cm^3 mit Wasser verdünnt, filtriert und auf pH = 6,8 eingestellt. Der Extrakt von stark fetthaltigem Material (Weizenkeime, Fleisch usw.) wird vor der pH-Einstellung zweckmässig mit Äthyläther ausgeschüttelt. Der Extrakt wird zuletzt so verdünnt, dass pro cm^3 ca. 0,02 γ Pantothenensäure enthalten sind.

Durchführung der Bestimmungen: Vgl. B₂-Versuch Seite 229. Standardansätze: 0,2 cm^3 (0,01 γ), 0,4 cm^3 (0,02 γ), 0,8 cm^3 (0,04 γ), 1,2 cm^3 (0,06 γ), 1,6 cm^3 (0,08 γ), 2,0 cm^3 (0,1 γ), 2,4 cm^3 (0,12 γ) und 3,0 cm^3 (0,15 γ) der Pantothenensäurestandardlösung. Extrakt Dosen: 1,0, 2,0 und 4,0 cm^3 . Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 5 cm^3 Wasser.

Auswertung: Vgl. Vitamin B₂-Bestimmung (Seite 229).

Bestimmung von Biotin

Methode nach E. C. Barton-Urigh¹³⁾ mit *Lactobacillus arabinosus* 17/5¹⁴⁾

Dauerkultur: Die Bereitung des Nährbodens, Überimpfung und Bebrütung erfolgt wie für die Nicotinsäurebestimmung beschrieben (Seite 231) *).

Nährlösung: 500 cm^3 Nährlösung enthalten:

Glucose	10 g
Natriumacetat (wasserhaltig)	10 g
Natriumchlorid	5 g
Ammoniumsulfat	3 g
Vitaminfreies Casein-Hydrolysat **) vgl. S. 231	50 cm^3

*) Für die Bereitung der Dauerkultur und Nährlösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

**) Es empfiehlt sich, das Caseinhydrolysat für den Biotinversuch zweimal mit je 20 g Kohle während 10 Minuten zu schütteln, anstatt nur einmal, wie für den Nicotinsäureversuch angegeben, damit das Hydrolysat sicher biotinfrei wird.

l-Cystinlösung	vgl. S. 227	25 cm ³
dl-Tryptophanlösung	vgl. S. 227	50 cm ³
Aneurinlösung	vgl. S. 231	1 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	2 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	4 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	8 cm ³
Pyridoxinlösung	vgl. S. 228	2 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Xanthinlösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Salzlösung A	vgl. S. 228	5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und mit 40 %iger Natronlauge auf pH = 6,8 eingestellt.

Biotinstandardlösung: Der Inhalt einer Ampulle (25 γ Biotin «Roche») wird mit 1 cm³ Salzlösung A (vgl. Seite 228) versetzt und auf 250 cm³ mit Wasser verdünnt. Diese Stammlösung wird im Eisschrank unter Toluol aufbewahrt und ist ca. 3 Monate haltbar. Zur Bereitung der Standardlösung wird 1 cm³ der Stammlösung mit Wasser auf 1000 cm³ verdünnt, so dass 1 cm³ 0,0001 γ (= 0,1 m γ) Biotin enthält.

Impflösung: Die Bereitung der Impflösung erfolgt wie für die Nicotinsäurebestimmung beschrieben (vgl. Seite 232).

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Das zerkleinerte Material wird zur Hydrolyse während 2 Stunden mit 6 n-Schwefelsäure bei 120° C im Autoklaven gehalten. Nach Abkühlen und Zusatz von ca. 0,7 g Natriumacetat wird mit Natronlauge bis pH = 4,5 neutralisiert, die Lösung filtriert, ein aliquoter Teil auf pH = 6,8 eingestellt und so verdünnt, dass pro cm³ ca. 0,1 m γ Biotin enthalten sind. Bei stark fetthaltigen Substanzen empfiehlt sich vor der Hydrolyse eine 10stündige Extraktion mit Petroläther (Sdp. 40—60° C). Nachdem das Hydrolysat auf pH = 4,5 eingestellt ist, wird nochmals mit Petroläther ausgeschüttelt und erst dann ein aliquoter Teil auf pH = 6,8 eingestellt und verdünnt.

Durchführung der Bestimmungen: Vgl. B₂-Versuch Seite 229. Standardansätze: 1,0 cm³ (0,1 m γ), 1,5 cm³ (0,15 m γ), 1,75 cm³ (0,175 m γ), 2,0 cm³ (0,2 m γ), 2,5 cm³ (0,25 m γ) und 5,0 cm³ (0,5 m γ) der Biotinstandardlösung. Extrakt-dosen: 1,0, 2,0 und 4,0 cm³.

Auswertung: Vgl. Vitamin B₂-Bestimmung (Seite 229).

Bestimmung von Folsäure

Methode nach *Capps* und Mitarbeitern¹⁵⁾ mit *Streptococcus lactis* R¹⁶⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Bacto-Micro Assay Culture Agar (Difco) gezüchtet:

2,0 ‰	Hefeextrakt (Difco)
0,5 ‰	Proteose Pepton Nr. 3 (Difco)
1,0 ‰	Glucose
0,2 ‰	KH ₂ PO ₄
1,0 ‰	Agar

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur 24—48 Stunden bei 37° C gehalten, anschliessend im Eisschrank bei 4° C aufbewahrt.

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Vitaminfreies Casein (Vitamin Free Casamino Acids, Difco)		6 g
Glucose		20 g
Natriumcitrat		10 g
l-Cystinlösung	vgl. S. 227	25 cm ³
dl-Tryptophanlösung	vgl. S. 227	25 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Aneurinlösung	vgl. S. 231	10 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	40 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	10 cm ³
p-Aminobenzoesäurelösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Biotinlösung	vgl. S. 231	4 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	2 cm ³
Salzlösung A	vgl. S. 228	5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und mit 40 ‰iger Natronlauge auf pH = 6,8 eingestellt *).

Folsäurestandardlösung: 1 mg synthetische Folsäure wird in 250 cm³ Wasser gelöst und mit 90 ‰igem Äthanol auf 500 cm³ verdünnt. Diese Stammlösung ist im Eisschrank ca. 3 Monate haltbar. Zur Bereitung der Standardlösung wird 1 cm³ der Stammlösung mit Wasser auf 1000 cm³ verdünnt, so dass 1 cm³ 0,002 γ (= 2 m γ) Folsäure enthält.

Impflösung: Für die Impflösung wird Bacto Micro Inoculum Broth (Difco) verwendet. Sie besteht aus:

*) Für die Bereitung der Dauerkultur, Impflösung und Nährlösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

2,0 % Hefeextrakt (Difco)
 0,5 % Proteose Pepton Nr. 3 (Difco)
 1,0 % Glucose
 0,2 % KH_2PO_4

Je 10 cm³ werden in Zentrifugengläser eingefüllt und geimpft. Nach Bebrütung während 24 Stunden bei 37° C werden die Röhren zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und durch sterile physiologische Kochsalzlösung ersetzt. 1 cm³ der Suspension wird mit Kochsalzlösung auf ca. 100 cm³ verdünnt.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: 1 g des zerkleinerten Materials wird in 8 cm³ 1%iger Natriumacetatlösung (pH = 4,5—4,7) suspendiert, mit 20 mg Taka-Diastase in 1 cm³ Wasser versetzt und die Mischung unter Toluol während 24 Stunden bei 37° C gehalten. Dann wird die Lösung neutralisiert, 15 Minuten bei 120° C im Autoklaven gehalten und so verdünnt, dass 1 cm³ ca. 2 mγ Folsäure enthält.

Durchführung der Bestimmungen: Ausführung im Prinzip wie beim B₁-Versuch (Seite 234). Standardansätze: 0,5 cm³ (1 mγ), 1,0 cm³ (2 mγ), 2,0 cm³ (4 mγ), 3,0 cm³ (6 mγ), 4,0 cm³ (8 mγ), 4,5 cm³ (9 mγ) und 5,0 cm³ (10 mγ) der Standardlösung. Extraktdosen: 1,0, 2,0 und 4,0 cm³. Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 5 cm³ Wasser. Sterilisation: 15 Minuten bei 120° C. Bebrütungszeit: 18—24 Stunden bei 37° C. Ermittlung des Trübungswertes wie beim B₁-Versuch.

Auswertung: Vgl. Vitamin B₁-Bestimmung Seite 234.

Bestimmung von p-Aminobenzoensäure

Methode nach *Landy* und *Dicken*¹⁷⁾ mit *Acetobacter suboxydans*¹⁸⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Schrägagar von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

0,5 % Hefeextrakt (Difco)	} auf pH = 6 einstellen.
5,0 % Glycerin	
2,0 % Agar	

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur während 72 Stunden bei 30° C gehalten, anschliessend bei 4° C aufbewahrt.

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Vitaminfreies Casein (Vitamin Free Casamino Acids, Difco)	6 g
Glycerin	50 g
l-Tryptophan	100 mg
l-Cystin	75 mg

Salzlösung A	vgl. S. 228	5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	10 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	10 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 6 eingestellt.

p-Aminobenzoessäurestandardlösung: 10 mg p-Aminobenzoessäure werden in 1000 cm³ Wasser suspendiert und zur vollständigen Lösung 3—4 Tropfen Eisessig zugegeben. 1 cm³ dieser Lösung wird mit Wasser auf 500 cm³ verdünnt, so dass 1 cm³ 0,02 γ p-Aminobenzoessäure enthält.

Impflösung: Zur Bereitung der Impflösung wird p-Aminobenzoessäurenährlösung verwendet. Pro 5 cm³ werden 0,05 γ p-Aminobenzoessäure zugegeben und auf 10 cm³ mit Wasser ergänzt. Nach Bebrütung während 24 Stunden bei 30° C wird zentrifugiert, 2 mal wie unter Nicotinsäurebestimmung (Seite 232) beschrieben mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und in ca. 15 cm³ Kochsalzlösung suspendiert.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Lösliche Substanzen werden in Wasser gelöst. Unlösliches Material wird zur Extraktion während 30 Minuten mit dem 15—20fachen Volumen Wasser bei 120° C im Autoklaven gehalten. Nach Filtration wird der Extrakt so verdünnt, dass pro cm³ ca. 0,01 γ p-Aminobenzoessäure enthalten sind.

Durchführung der Bestimmungen: Ausführung im Prinzip wie beim B₁-Versuch (Seite 234). Standardansätze: 0,5 cm³ (0,01 m γ), 1,0 cm³ (0,02 m γ), 1,5 cm³ (0,03 γ), 2,0 cm³ (0,04 γ), 2,5 cm³ (0,05 γ), 3,75 cm³ (0,075 γ), und 5,0 cm³ (0,1 γ) der Standardlösung. Extrakt Dosen: 1,0, 2,0 und 4,0 cm³. Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 5 cm³ Wasser. Sterilisation: 15 Minuten bei 120° C. Bebrütungszeit: 48 Stunden bei 30° C. Ermittlung des Trübungswertes wie beim B₁-Versuch.

Auswertung: Vgl. Vitamin B₁-Bestimmung Seite 234.

Bestimmung von Inosit

Methode nach G. W. Beadle¹⁹⁾ mit *Neurospora crassa* 37401a²⁰⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Bacto *Neurospora Culture Agar* (Difco) gezüchtet:

0,5 %	Hefeextrakt (Difco)
0,5 %	Proteose Pepton Nr. 3 (Difco)
4,0 %	Maltose
1,5 %	Agar

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur 3—4 Tage bei 30° C gehalten, anschliessend bei 4° C aufbewahrt *).

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Ammoniumtartrat		2,5	g
Ammoniumnitrat		0,5	g
KH ₂ PO ₄		0,5	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O		0,25	g
NaCl		50,0	mg
CaCl ₂		50,0	mg
Rohrzucker		10,0	g
Biotinlösung	vgl. S. 231	25,0	cm ³

Spurenelemente (als Salze zugegeben):

H ₃ BO ₃	28 γ	d. h. 1 cm ³ einer	2,8 mg ^{0/0} Lösung
CuSO ₄	175 γ	» 1 cm ³ »	17,5 mg ^{0/0} »
FeSO ₄	500 γ	» 1 cm ³ »	50,0 mg ^{0/0} »
MnSO ₄	40 γ	» 1 cm ³ »	4,0 mg ^{0/0} »
MoO ₃	15 γ	» 1 cm ³ »	1,5 mg ^{0/0} »
ZnSO ₄	4,43 mg	» 1 cm ³ »	0,443 0/0 »

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 5.5 eingestellt.

Inositstandardlösung: 10 mg Inosit werden in 500 cm³ Wasser gelöst, so dass 1 cm³ 20 γ Inosit enthält.

Impflösung: Zur Bereitung der Impflösung wird mit einer Platinoese eine kleine Menge Sporen von einer 4 Tage alten Dauerkultur entnommen und in ca. 10 cm³ 0,9 0/oiger steriler Kochsalzlösung suspendiert.

Bereitng der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Das zerkleinerte Material wird mit 18 0/oiger Salzsäure während 6 Stunden am Rückfluss gekocht und nach Neutralisation auf pH = 5,5 so verdünnt, dass 1 cm³ ca. 20 γ Inosit enthält.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefässe dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt 11 cm³, das heisst 10 cm³ Nährlösung + Analyse oder Standard mit Wasser auf 11 cm³ ergänzt. Standarddosen: 0,125 cm³ (2,5 γ), 0,25 cm³ (5 γ), 0,5 cm³ (10 γ), 0,75 cm³ (15 γ) und 1,0 cm³ (20 γ) der Standardlösung. Extrakt Dosen: 0,25, 0,5 und 1,0 cm³. Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 1 cm³ Wasser. Sterilisation: 15 Minuten bei 115° C. Nach 3tägiger Bebrütung bei 30° C wird das Mycel durch Abnutschen

*) Für die Bereitung der Dauerkultur ist ein gebrauchsfertiges Präparat von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

von der Nährlösung abgetrennt, mit Wasser ausgewaschen, zwischen Filtrierpapier leicht gepresst, während ca. 3 Stunden bei 100° C getrocknet und das Trockengewicht ermittelt.

Auswertung: Standarddosen und Trockengewichte werden im Koordinatensystem miteinander in Beziehung gebracht. Vgl. Vitamin B₂-Bestimmung Seite 229.

Bestimmung von Cholin

Methode nach *Horowitz* und *Beadle* ²¹⁾ mit *Neurospora crassa* 34486 ²²⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Bacto *Neurospora Culture Agar* (Difco) gezüchtet (vgl. Inositbestimmung Seite 243).

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Ammoniumtartrat	2,5	g
Ammoniumnitrat	0,5	g
KH ₂ PO ₄	0,5	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25	g
NaCl	50,0	mg
CaCl ₂	50,0	mg
Rohrzucker	10,0	g
Biotinlösung	vgl. S. 231	25,0 cm ³

Spurenelemente (als Salze zugegeben):

H ₃ BO ₃	28 γ	d. h. 1 cm ³ einer	2,8 mg ^{0/0} Lösung
CuSO ₄	175 γ	» 1 cm ³ »	17,5 mg ^{0/0} »
FeSO ₄	500 γ	» 1 cm ³ »	50,0 mg ^{0/0} »
MnSO ₄	40 γ	» 1 cm ³ »	4,0 mg ^{0/0} »
MoO ₃	15 γ	» 1 cm ³ »	1,5 mg ^{0/0} »
ZnSO ₄	4,43 mg	» 1 cm ³ »	0,443 0/0 »

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 5,5 eingestellt.

Cholinstandardlösung: 5 mg Cholin werden in 1000 cm³ Wasser gelöst, so dass 1 cm³ 5 γ Cholin enthält.

Impflösung: Zur Bereitung der Impflösung wird mit einer Platinoese eine kleine Menge Sporen von einer Dauerkultur entnommen und in ca. 10 cm³ sterilem Wasser suspendiert.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: 100 mg des trockenen, zerkeimerten Materials werden mit 10 cm³ 30%iger Schwefelsäure während 2 Stunden bei 120° C im Autoklaven gehalten. Nach Abkühlen wird mit gesättigter Bariumhydroxydlösung neutralisiert (Kongorot) und zentrifugiert. Der Bariumsulfatniederschlag wird mit wenig Wasser heiss ausgewaschen, die beiden überstehenden Lösungen vereinigt, filtriert und mit n-Natronlauge

neutralisiert (Lackmus). Der Extrakt wird mit Wasser auf das gewünschte Volumen verdünnt. Zur Entfernung des Methionins und anderer Substanzen, die das Wachstum beeinflussen können, wird der Extrakt nun durch eine Permutitsäule durchgelassen. Zu diesem Zwecke werden Röhrchen von 110×6 mm verwendet, die ca. 1 g Permutit enthalten. 5—10 cm³ des Extraktes (je nach Cholingehalt) werden durch die Permutitsäule durchgelassen, die Säule mit 5 cm³ 0,3 %iger Natriumchloridlösung gewaschen und die Filtrate verworfen. Das adsorbierte Cholin wird aus dem Permutit mit 10 cm³ 5%iger Natriumchloridlösung herausgelöst und das Volumen der Cholinlösung mit Wasser auf 10 cm³ ergänzt. 1 cm³ der Lösung soll ca. 5 γ Cholin enthalten.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefäße dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt 12 cm³, das heisst 10 cm³ Nährlösung + Analyse oder Standard mit Wasser auf 12 cm³ ergänzt. Standarddosen: 0,1 cm³ (0,5 γ), 0,2 cm³ (1,0 γ), 0,4 cm³ (2,0 γ), 0,8 cm³ (4,0 γ), 1,2 cm³ (6,0 γ), 1,6 cm³ (8,0 γ) und 2,0 cm³ (10,0 γ) der Standardlösung. Extraktdosen: 0,4, 0,8 und 1,6 cm³. Als Leerwert werden 10 cm³ Nährlösung mit 2 cm³ versetzt. Sterilisation: 10 Minuten bei 120° C. Nach 3tägiger Bebrütung bei 30° C wird das Mycel durch Abnutschen von der Nährlösung befreit, mit Wasser ausgewaschen, zwischen Filtrierpapier leicht gepresst, während ca. 3 Stunden bei 100° C getrocknet und das Trockengewicht ermittelt.

Auswertung: Standarddosen und Trockengewichte werden im Koordinatensystem miteinander in Beziehung gebracht. Vgl. Vitamin B₂-Bestimmung Seite 229.

Bestimmung von Vitamin B₁₂

Methode nach *Capps* und Mitarbeitern²³⁾ mit *Lactobacillus leichmannii*²⁴⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Bacto-Micro Assay Culture Agar (Difco) gezüchtet (Stichkultur) (Zusammensetzung vgl. Folsäurebestimmung S. 241). Die Überimpfung erfolgt alle 14 Tage. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur 48 Stunden bei 37° C gehalten, anschliessend bei 4° C aufbewahrt.

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Vitaminfreies Casein (Vitamin Free		
Casamino Acids, Difco)		6,0 g
Glucose		20,0 g
Natriumacetat		10,0 g
l-Cystinlösung	vgl. S. 227	25,0 cm ³
dl-Tryptophanlösung	vgl. S. 227	25,0 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10,0 cm ³
Xanthinlösung	vgl. S. 227	0,5 cm ³
Aneurinlösung	vgl. S. 231	10,0 cm ³

Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	40,0 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	10,0 cm ³
Pyridoxinlösung	vgl. S. 228	20,0 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	1,0 cm ³
Folsäurelösung (Stammlösung)	vgl. S. 233	25,0 cm ³
Biotinlösung	vgl. S. 231	50,0 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung	vgl. S. 228	1,0 cm ³
Tween 80		100,0 mg
Salzlösung A (100fach verdünnt)	vgl. S. 228	0,5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	0,5 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 6,8 eingestellt *).

Vitamin B₁₂-Standardlösung: 1 Ampulle B₁₂ (= 1 γ B₁₂) wird mit Wasser auf 40 cm³ verdünnt. 1 cm³ dieser Lösung wird mit Wasser auf 500 cm³ ergänzt, so dass 1 cm³ 0,05 mγ B₁₂ enthält.

Impflösung: Für die Bereitung der Impflösung wird Bacto-Micro Inoculum Broth verwendet (Zusammensetzung vgl. Folsäurebestimmung Seite 241). Nach Bebrütung während 24 Stunden bei 37° C werden die Röhrchen zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Es wird wiederum zentrifugiert, abgegossen und mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Diese Suspension wird mit Kochsalzlösung auf ca. das doppelte Volumen verdünnt.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefäße dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt 4 cm³, das heisst 2 cm³ Nährlösung + Analyse oder Standard mit Wasser auf 4 cm³ ergänzt. Standarddosen: 0,2 cm³ (0,01 mγ), 0,4 cm³ (0,02 mγ), 0,8 cm³ (0,04 mγ), 1,2 cm³ (0,06 mγ), 1,6 cm³ (0,08 mγ) und 2,0 cm³ (0,1 mγ) der Standardlösung. Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 2 cm³ Wasser.

Sterilisation: Da B₁₂ durch Erhitzen zerstört wird, wird nur die B₁₂-freie Nährlösung im Autoklaven während 5 Minuten bei 115° C gehalten. Standardlösung und zu analysierender Extrakt werden durch Filtration mit dem Seitz-Filter sterilisiert ²⁵⁾).

Auswertung: Nach 3tägiger Bebrütung bei 37° C wird durch Titration mit n/20 Natronlauge und Bromthymolblau als Indikator der Milchsäuregehalt bestimmt. Die Titrationswerte werden in einem Koordinatensystem mit den zugehörigen Standardwerten in Beziehung gesetzt, aus der Kurve der Gehalt der einzelnen Extrakt Dosen ermittelt und der Durchschnittswert errechnet.

*) Für die Bereitung der Dauerkultur, Impflösung und Nährlösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

Aminosäurebestimmungen

Allgemeines

Intraprotein-gebundene Aminosäuren sind der mikrobiologischen Bestimmung mit Hilfe von Milchsäurebakterien nicht direkt zugänglich. Sie müssen aus dem Eiweiss durch hydrolytische Aufspaltung freigesetzt werden. Genauere Angaben darüber finden sich bei den einzelnen Bestimmungsmethoden.

Wenn der Gehalt an *freien Aminosäuren* bestimmt werden soll, wird das Eiweiss gefällt und die enteweisste Lösung analysiert. Bei der Wahl der Enteiweissungsmethode muss berücksichtigt werden, dass das Fällungsmittel das Wachstum der Mikroorganismen beeinträchtigen kann, so dass nur solche Methoden geeignet sind, bei welchen die Entfernung des Fällungsmittels möglich ist. Enteiweissung mit Hilfe von Wolframsäure oder Quecksilberchlorid hat sich als geeignet erwiesen. Der zu enteweisende Extrakt wird mit je $\frac{1}{8}$ des Extraktvolumens 10 %iger Natriumwolframatlösung und $\frac{2}{3}$ n-Schwefelsäure versetzt. Nach ca. 30 Minuten wird der Niederschlag durch Zentrifugieren abgetrennt, die überstehende Lösung zur Ausfällung der überschüssigen Wolfram- und Schwefelsäure mit einer Spatelspitze festem, pulverisiertem Bariumhydroxyd versetzt (ca. pH = 10). Das Filtrat wird mit einigen Tropfen konz. Schwefelsäure bis ca. pH = 6 neutralisiert, so dass eventuell im Überschuss vorhandene Bariumionen entfernt werden. Die Enteiweissung mit Hilfe von Quecksilberchlorid gestaltet sich folgendermassen: 1 Teil des Extraktes wird mit je 2 Teilen 2 %iger Salzsäure und 5 %iger Quecksilberchloridlösung versetzt. Nach ca. 2stündigem Stehen wird zentrifugiert, im Filtrat das Quecksilber durch Durchleiten von Schwefelwasserstoff gefällt, dieser durch Durchsaugen von Luft entfernt und das Filtrat auf ca. pH = 6 neutralisiert.

Im Gegensatz zu den intraprotein-gebundenen Aminosäuren können die zur Bestimmung verwendeten Mikroorganismen im allgemeinen an Stelle von freien Aminosäuren auch in Form von *Peptiden und Polypeptiden* gebundene Aminosäuren verwerten, so dass sie zusammen mit den freien Aminosäuren mitbestimmt werden. Bei Verwendung der angeführten Enteiweissungsmethoden werden Polypeptide weitgehend ausgefällt.

Hinsichtlich *Spezifität* sind die einzelnen Bestimmungsmethoden insofern verschieden, als bei einzelnen nur die natürlichen l-Aminosäuren, bei anderen neben der l-Form auch die unnatürlichen d-Aminosäuren bestimmt werden. Dieser Umstand muss bei der hydrolytischen Aufspaltung berücksichtigt werden, das heisst, es muss eine Racemisierung der Aminosäuren möglichst vermieden werden.

Die Herstellung der *Nährlösung* bereitet oft Schwierigkeiten, weil die einzelnen käuflichen Aminosäuren unter Umständen mit anderen verunreinigt sind. Es ist notwendig, sie durch mehrmaliges Umkristallisieren zu reinigen. Besonders häufig sind Verunreinigungen mit Glykokoll, so dass für die Glykokollbestim-

mung ausschliesslich umkristallisierte Aminosäuren zu verwenden sind. Aus Eiweiss gewonnenes l-Leucin ist im allgemeinen mit Methionin verunreinigt und auch durch häufiges Umkristallisieren nicht genügend rein zu bekommen. Es ist für die Methioninbestimmung ausschliesslich dl-Leucin zu verwenden. Im übrigen ist der Reinheitsgrad der Aminosäurepräparate verschiedener Herkunft sehr unterschiedlich, so dass von Fall zu Fall abgeklärt werden muss, ob eine Reinigung notwendig ist ^{25a}).

Bestimmung von Valin, Histidin, Arginin, Lysin, Tryptophan und Threonin

Methode nach *Stokes* und Mitarbeitern ²⁶) mit *Streptococcus faecalis* ²⁷)

Sie eignet sich für die Bestimmung der oben angeführten Aminosäuren. Die zu bestimmende Aminosäure wird aus der Nährlösung weggelassen und nachher, wie unten angegeben, als Standarddose zugesetzt.

Dauerkultur: Der Stamm wird auf Schrägagar von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

1,0 ‰ Glucose	}	auf pH = 6,8 einstellen
0,5 ‰ Bacto-Pepton (Difco)		
1,0 ‰ Natriumacetat (wasserhaltig)		
1,25 cm ³ Salzlösung A vgl. S. 228		
1,25 cm ³ Salzlösung B vgl. S. 228		
1,5 ‰ Agar		

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur 16—24 Stunden bei 37° C gehalten, anschliessend bei 4° C aufbewahrt.

Nährlösung: Ausser den oben angeführten Stammlösungen wird noch eine *Pyridoxaminlösung* benötigt, welche folgendermassen bereitet wird: 10 mg Pyridoxamin (Merck & Co., Inc. Rahway, N.J.) werden in 100 cm³ Wasser gelöst. Haltbarkeit unter Toluol im Eisschrank: 8 Tage.

500 cm³ Nährlösung enthalten:

dl-Leucin	200 mg
dl-Isoleucin	200 mg
dl-Valin	200 mg
l-Cystin *)	200 mg
dl-Methionin	200 mg
dl-Tryptophan	400 mg
l-Tyrosin *)	200 mg

*) Cystin und Tyrosin müssen, bevor sie zur Nährlösung zugegeben werden, gelöst werden:

Cystin:	pro 100 mg	1 cm ³ 2 n-Salzsäure.
Tyrosin:	pro 100 mg	1 cm ³ n-Natronlauge.

dl-Phenylalanin		200 mg
dl-Glutaminsäure		200 mg
dl-Threonin		200 mg
dl-Alanin		200 mg
dl-Asparaginsäure		200 mg
l-Lysin		100 mg
l-Arginin		200 mg
l-Histidin		200 mg
dl-Serin		200 mg
l-Prolin		200 mg
l-Oxyprolin		200 mg
dl-Norleucin		200 mg
Glykokoll		200 mg
Glucose		10 g
Natriumacetat (wasserhaltig)		10 g
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	2 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	8 cm ³
Aneurinlösung	vgl. S. 231	2 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	2 cm ³
Pyridoxaminlösung		4 cm ³
p-Aminobenzoesäurelösung	vgl. S. 228	0,4 cm ³
Biotinlösung	vgl. S. 231	2 cm ³
Folsäurelösung (Stammlösung)	vgl. S. 233	1 cm ³
Salzlösung A	vgl. S. 228	5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 6,8 eingestellt.

An Stelle der dl-Aminosäuren kann auch die l-Form verwendet werden. In diesem Falle wird nur die halbe Menge eingewogen.

Impflösung: Für die Impflösung dient eine Nährlösung der gleichen Zusammensetzung wie unter Dauerkultur angegeben; der Agar wird jedoch weggelassen. In Zentrifugengläser von 15 bis 20 cm³ Inhalt werden 10 cm³ eingefüllt. Nach einer Bebrütungszeit von 16 bis 24 Stunden bei 37° C werden die Röhrchen zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und durch steriles Wasser ersetzt. Es wird wiederum zentrifugiert, abgegossen und mit Wasser aufgefüllt. Diese Suspension wird auf ca. 100 cm³ mit Wasser verdünnt.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Valin, Histidin, Arginin, Lysin und Threonin wird 1 g des getrockneten zerkleinerten Materials in einer verschlossenen 20-cm³-Ampulle mit 10 cm³ 10 %iger Salzsäure während 10 Stunden im Autoklaven

bei 120° C gehalten. Nach Abkühlen werden die Ampullen geöffnet, der Inhalt mit ca. 25 cm³ Wasser in ein Becherglas gespült und mit 5 n-Natronlauge auf pH = 6,8 eingestellt. Der Extrakt wird wenn nötig filtriert und mit Wasser auf das gewünschte Volumen verdünnt.

Da das Tryptophan durch saure Hydrolyse zerstört wird, wird bei der Tryptophanbestimmung an Stelle von Salzsäure 5 n-Natronlauge verwendet (10 cm³ pro 0,5 g des zu untersuchenden Materials). Weiteres Vorgehen wie oben beschrieben.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefäße dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt 10 cm³: 5 cm³ Nährlösung werden nach Zusatz des Standards bzw. des Extraktes auf 10 cm³ mit Wasser ergänzt. Sterilisation: 15 Minuten bei 115° C. Nach 3tägiger Bebrütung bei 37° C wird durch Titration mit n/20 Natronlauge und Bromthymolblau als Indikator der Milchsäuregehalt bestimmt.

Standardwerte:

l-Valin	0	2	4	8	12	16	20	25	30	35	40	
									60	80	100	γ
l-Histidin	0	2	4	6	8	10	12	16	20	30		γ
l-Arginin	0	2	4	8	12	16	20	25	30	40	50	γ
l-Lysin	0	10	15	20	30	40	50	60	80	100		γ
l-Tryptophan	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	2,0	2,5	γ
dl-Threonin	0	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60	γ

Die Konzentrationen der Aminosäurestandardlösungen sollen so gewählt werden, dass pro Ansatz nicht mehr als 5 cm³ eingefüllt werden müssen.

Auswertung: Die Titrationswerte werden in einem Koordinatensystem mit den zugehörigen Standardwerten in Beziehung gesetzt, aus der Kurve der Gehalt der einzelnen Extrakt Dosen ermittelt und der Durchschnittswert errechnet.

Bestimmung von Asparaginsäure und Glutaminsäure bzw. Glutamin

Methode nach *Hac* und *Snell* ²⁸⁾ mit *Leuconostoc mesenteroides* P-60 ²⁹⁾ bzw. nach *Hac*, *Snell* und *Williams* ³⁰⁾ mit *Lactobacillus arabinosus* 17/5 ³¹⁾

Die zu bestimmende Aminosäure wird aus der Nährlösung weggelassen und nachher, wie unten angegeben, als Standarddose zugesetzt.

Dauerkultur: Die Stämme werden auf Schrägagar von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

- 1,0 % Glucose
- 1,0 % Hefeextrakt (Difco)
- 1,5 % Agar

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung werden die Kulturen 24 Stunden bei 37° C gehalten, anschliessend bei 4° C aufbewahrt *).

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

l-Arginin		100 mg
l-Cystin **)		100 mg
Glykokoll		100 mg
l-Histidin		100 mg
l-Oxyprolin		100 mg
l-Leucin		100 mg
l-Lysin		100 mg
l-Prolin		100 mg
l-Tryptophan ***)		100 mg
L-Tyrosin **)		100 mg
l-Asparaginsäure		400 mg
l-Glutaminsäure		1000 mg
dl-Alanin		200 mg
dl-Isoleucin		200 mg
dl-Methionin ***)		200 mg
dl-Norleucin ***)		200 mg
dl-Norvalin ***)		200 mg
dl-Phenylalanin ***)		200 mg
dl-Serin ***)		200 mg
dl-Threonin		200 mg
dl-Valin		200 mg
Biotinlösung	vgl. S. 231	10 cm ³
Folsäurelösung (Stammlösung)	vgl. S. 233	5 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	2 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	2 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	8 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung	vgl. S. 228	3 cm ³
Aneurinlösung	vgl. S. 231	5 cm ³
Cholin		2,5 mg
Inosit		2,5 mg
Pyridoxinlösung †)	vgl. S. 228	100 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10 cm ³

*) Für die Bereitung der Dauerkulturen ist ein gebrauchsfertiges Präparat von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

***) Cystin und Tyrosin: vgl. S. 249.

***) Für Glutaminsäurebestimmung nur die Hälfte.

†) Für Glutaminsäurebestimmung nur 1/10.

Xanthinlösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Salzlösung A *)	vgl. S. 228	10 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³
Ammoniumsulfat		3 g
Natriumacetat (wasserhaltig)		10 g
Glucose		10 g

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 6,8 eingestellt.

Impflösung: Für die Bereitung der Impflösung wird eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung benötigt:

Bacto-Pepton (Difco)		500 mg
Hefeextrakt (Difco)		100 mg
Natriumacetat		1 g
Glucose		1 g
Salzlösung A	vgl. S. 228	0,5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	0,5 cm ³
Wasser		ad 100 cm ³

Je 10 cm³ werden in Zentrifugengläser eingefüllt und geimpft. Nach Bebrütung während 18—24 Stunden bei 37° C werden die Röhrchen zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und durch sterile physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Es wird wiederum zentrifugiert, abgegossen und die Bakterien in ca. 10 cm³ physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Asparaginsäure oder Glutaminsäure werden 100 mg des zerkleinerten Materials mit 2 cm³ 10 %iger Salzsäure in einer verschlossenen Ampulle während ca. 10 Stunden bei 120° C im Autoklaven gehalten. Nach Abkühlen werden die Ampullen geöffnet, der Inhalt mit wenig Wasser herausgespült, mit Natronlauge auf pH = 6,8 eingestellt und auf das gewünschte Volumen mit Wasser verdünnt.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefäße dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt 5 cm³: 2,5 cm³ Nährlösung werden nach Zusatz des Standards bzw. des Extraktes auf 5 cm³ mit Wasser ergänzt. Sterilisation: 15 Minuten bei 115° C. Wenn beabsichtigt ist, neben Glutaminsäure das Glutamin mitzubestimmen, wird im strömenden Dampf sterilisiert. Nach 3tägiger Bebrütung bei 37° C wird durch Titration mit n/20 Natronlauge und Bromthymolblau als Indikator der Milchsäuregehalt bestimmt.

*) Für Asparaginsäurebestimmung 4fache Menge.

Standardwerte:

l-Asparaginsäure	0	5	10	15	20	25	30	40	50			γ
l-Glutaminsäure	0	5	10	20	30	40	60	80	100	120	150	γ

Die Konzentrationen der Aminosäurestandardlösungen sollen so gewählt werden, dass pro Ansatz nicht mehr als 2,5 cm³ eingefüllt werden müssen.

Auswertung: Vgl. Seite 251.

Bestimmung von Alanin

Methode nach *Sauberlich* und *Baumann*³²⁾ mit *Leuconostoc citrovorum*³³⁾

Dauerkultur: Der Stamm wird in einer Agar-Stichkultur von folgender Zusammensetzung gezüchtet:

- 1,0 ‰ Glucose
- 1,0 ‰ Hefeextrakt (Difco)
- 1,5 ‰ Agar

Die Überimpfung erfolgt monatlich. Unmittelbar nach der Impfung wird die Kultur 24—48 Stunden bei 37° C gehalten, anschliessend bei 4° C aufbewahrt *).

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

l-Arginin	200 mg
l-Asparaginsäure	100 mg
l-Asparagin	400 mg
l-Cystein	50 mg
l-Glutaminsäure	300 mg
Glykokoll	100 mg
l-Histidin	50 mg
dl-Isoleucin	250 mg
dl-Leucin	250 mg
l-Lysin	200 mg
dl-Methionin	100 mg
dl-Phenylalanin	100 mg
l-Prolin	100 mg
dl-Serin	50 mg
dl-Threonin	200 mg
dl-Tryptophan	40 mg
l-Tyrosin **)	100 mg
dl-Valin	250 mg
Glucose	25 g
Natriumacetat	20 g

*) Für die Bereitung der Dauerkultur und Impflösung sind gebrauchsfertige Präparate von der Firma Difco Laboratories Inc., Detroit 1, Michigan, erhältlich.

***) Tyrosin: vgl. S. 249.

Ammoniumchlorid		3 g
Salzlösung A	vgl. S. 228	6 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Xanthinlösung	vgl. S. 227	10 cm ³
Aneurinlösung	vgl. S. 231	5 cm ³
Pyridoxinlösung	vgl. S. 228	10 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	5 cm ³
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	20 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	10 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung	vgl. S. 228	1 cm ³
Biotinlösung	vgl. S. 231	10 cm ³
Folsäurelösung (Stammlösung)	vgl. S. 233	5 cm ³
Lilly's Reticulogen *)		0,1 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 6,8 eingestellt.

Impflösung: Für die Bereitung der Impflösung wird Bacto-Micro Inoculum Broth (Difco) verwendet (Zusammensetzung vgl. Folsäurebestimmung Seite 241). Nach Bebrütung während 24 Stunden bei 37° C werden die Röhrchen zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Es wird wiederum zentrifugiert, abgegossen und die Bakterien in ca. 10 cm³ Kochsalzlösung suspendiert.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Wenn der Gesamtgehalt an Alanin bestimmt werden soll, werden 200 mg des getrockneten zerkleinerten Materials mit 10 cm³ 4n-Salzsäure in verschlossenen Ampullen während 8 Stunden bei 120° C im Autoklaven gehalten. Nach Abkühlen wird der Inhalt auf pH = 6,8 eingestellt und mit Wasser auf das gewünschte Volumen verdünnt.

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefäße dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt 4 cm³: 2 cm³ Nährlösung werden nach Zusatz des Standards bzw. des Extraktes auf 4 cm³ mit Wasser ergänzt. Sterilisation: 15 Minuten bei 115° C. Nach 3tägiger Bebrütung bei 37° C wird durch Titration mit n/20 Natronlauge und Bromthymolblau als Indikator der Milchsäuregehalt bestimmt.

Standardwerte: 0 2,5 5 10 20 30 40 50 γ l-Alanin.

Die Konzentration der Alaninlösung soll so gewählt werden, dass pro Ansatz nicht mehr als 2 cm³ eingefüllt werden müssen.

Auswertung: Vgl. Seite 251.

*) Hersteller: Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA, vertreten durch Schweiz. Serum- und Impfinstitut, Bern.

Bestimmung von Cystin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin, Methionin, Serin, Prolin und Glykokoll

Methode nach *Dunn* und Mitarbeitern³⁴⁾ mit *Leuconostoc mesenteroides* P-60³⁵⁾

Der *Leuconostoc mesenteroides* P-60 eignet sich wie der *Streptococcus faecalis* für die Bestimmung mehrerer Aminosäuren. Es wird für alle Aminosäuren dieselbe Nährlösung verwendet und jeweils die zu bestimmende weggelassen.

Dauerkultur: Die Bereitung des Nährbodens, Überimpfung und Bebrütung erfolgt wie für die Asparaginsäurebestimmung geschrieben (Seite 251).

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Glykokoll		160 mg
dl-Alanin		3000 mg
l-Arginin		120 mg
l-Asparagin		600 mg
l-Cystin *)		80 mg
l-Glutaminsäure		200 mg
l-Histidin		20 mg
l-Oxyprolin		80 mg
dl-Isoleucin		120 mg
l-Leucin		80 mg
l-Lysin		120 mg
dl-Methionin		60 mg
dl-Norleucin		80 mg
dl-Norvalin		80 mg
dl-Phenylalanin		120 mg
l-Prolin		80 mg
l-Tyrosin *)		40 mg
dl-Serin		160 mg
dl-Threonin		400 mg
l-Tryptophan		20 mg
dl-Valin		120 mg
Glucose		20 g
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	12 cm ³
Natriumacetat		12 g
Ammoniumchlorid		6 g
Salzlösung A	vgl. S. 228	5 cm ³
Salzlösung B	vgl. S. 228	5 cm ³
Aneurinlösung	vgl. S. 231	10 cm ³
Pyridoxinlösung	vgl. S. 228	16 cm ³
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	20 cm ³

*) Cystin und Tyrosin: vgl. S. 249.

Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	80 cm ³
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	20 cm ³
Biotinlösung	vgl. S. 231	50 cm ³
Folsäurelösung (Stammlösung)	vgl. S. 233	1 cm ³
p-Aminobenzoessäurelösung (1000fach verdünnt)	vgl. S. 228	1 cm ³

Die frisch bereitete Lösung wird auf 100° C erhitzt, filtriert und auf pH = 6,8 eingestellt.

Impflösung: Vgl. Asparaginsäure- und Glutaminsäurebestimmung (Seite 253).

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Vgl. Alaninbestimmung (Seite 255).

Durchführung der Bestimmungen: Als Versuchsgefäße dienen grosse Reagenzgläser von ca. 2 cm Durchmesser und mindestens 15 cm Länge. Das Gesamtflüssigkeitsvolumen beträgt 10 cm³: 5 cm³ Nährlösung werden nach Zusatz des Standards bzw. des Extraktes auf 10 cm³ mit Wasser ergänzt. Sterilisation: 15 Minuten bei 115° C. Nach 3tägiger Bebrütung bei 37° C wird durch Titration mit n/10 Natronlauge und Bromthymolblau als Indikator der Milchsäuregehalt bestimmt.

Standardwerte:

l-Cystin	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25				γ
l-Leucin	0	5	10	20	30	40	60	80	100				γ
l-Isoleucin	0	5	10	20	30	40	60	80	100				γ
l-Tyrosin	0	1	2	3	4	5	7,5	10	15	20	30		
									40	60	80		γ
l-Phenylalanin	0	5	10	15	20	30	40	60	80	100			γ
dl-Methionin	0	1	2	3	4	5	7,5	10	20	30	40		
									60	80	100		γ
dl-Serin	0	10	25	50	75	100	150	200					γ
l-Prolin	0	10	15	20	30	40	60	80	100				γ
Glykokoll	0	10	20	40	60	80	100	150	200				γ

Die Konzentrationen der Aminosäurestandardlösungen sollen so gewählt werden, dass pro Ansatz nicht mehr als 5 cm³ eingefüllt werden müssen.

Auswertung: Vgl. Seite 251.

Literatur

- ¹⁾ E. E. Snell und F. M. Strong, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **11**, 346 (1939), modifiziert nach E. C. Barton-Wright und R. G. Booth, Biochem. J. **37**, 25 (1943).
- ²⁾ Stamm Nr. 7469 der American Type Culture Collection, 2029 M Street, N. W., Washington 6, D. C.
- ³⁾ E. E. Snell und L. D. Wright, J. Biol. Chem. **139**, 675 (1941), modifiziert nach E. C. Barton-Wright, Biochem. J. **38**, 314 (1944); Analyst **70**, 283 (1945).

- 4) Stamm Nr. 8014 der American Type Culture Collection.
- 5) *H. P. Sarett* und *U. H. Cheldelin*, *J. Biol. Chem.* **155**, 153 (1944).
- 6) Stamm Nr. 9338 der American Type Culture Collection.
- 7) Stamm Nr. 8743 b der American Type Culture Collection.
- 8) *W. H. Schopfer* und *A. Jung*, *Z. Vitaminforschung* **7**, 143 (1938).
- 9) *J. L. Stokes*, *A. Larsen*, *C. R. Woodward* und *J. W. Foster*, *J. Biol. Chem.* **150**, 17 (1943), modifiziert nach *E. C. Barton-Wright*, *Analyst* **70**, 283 (1945).
- 10) Stamm Nr. 9276 der American Type Culture Collection.
- 11) *H. R. Skeggs* und *L. D. Wright*, *J. Biol. Chem.* **156**, 21 (1944), modifiziert nach *Difco Manual of Dehydrated Culture Media*, 8th Edition, *Difco Laboratories Inc.*, Detroit 1, Michigan; *E. C. Barton-Wright*, *Practical Methods for the Microbiological Assay of the Vitamin B Complex and Essential Amino Acids*, *Ashe Laboratories Ltd.*, London.
- 12) Stamm Nr. 8014 der American Type Culture Collection.
- 13) *E. C. Barton-Wright*, *Practical Methods for the Microbiological Assay of the Vitamin B Complex and Essential Amino Acids*, *Ashe Laboratories Ltd.*, London, 120—122 Victoria Street.
- 14) Stamm Nr. 8014 der American Type Culture Collection.
- 15) *B. F. Capps*, *N. L. Hobbs* und *S. H. Fox*, *J. Bact.* **55**, 869 (1948), modifiziert nach *Difco Manual of Dehydrated Culture Media*, 8th Edition, *Difco Laboratories Inc.*, Detroit 1, Michigan; *T. D. Luckey*, *G. M. Briggs, Jr.* und *C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **152**, 157 (1944).
- 16) Stamm Nr. 8043 der American Type Culture Collection.
- 17) *M. Landy* und *D. M. Dicken*, *J. Biol. Chem.* **146**, 109 (1942).
- 18) Stamm Nr. 621 der American Type Culture Collection.
- 19) *G. W. Beadle*, *J. Biol. Chem.* **156**, 683 (1944).
- 20) Stamm Nr. 9683 der American Type Culture Collection.
- 21) *N. H. Horowitz* und *G. W. Beadle*, *J. Biol. Chem.* **150**, 325 (1943).
- 22) Stamm Nr. 9277 der American Type Culture Collection.
- 23) *B. F. Capps*, *N. L. Hobbs* und *S. H. Fox*, *J. Biol. Chem.* **178**, 517 (1949).
- 24) Stamm Nr. 4797 der American Type Culture Collection.
- 25) *C. E. Hoffmann*, *E. L. R. Stokstad*, *B. L. Hutchings*, *A. C. Dornbush* und *Th. H. Jukes*, *J. Biol. Chem.* **181**, 635 (1949).
- 25a) *M. S. Dunn* und *L. B. Bockland*, *Advances in Protein Chemistry* (*Academic Press Inc.*, Publishers, New York, N.Y.) **3**, 295 (1947).
- 26) *J. L. Stokes*, *M. Guinness*, *J. M. Dwyer* und *M. C. Caswell*, *J. Biol. Chem.* **160**, 35 (1945).
- 27) Stamm Nr. 9790 der American Type Culture Collection.
- 28) *L. R. Hac* und *E. E. Snell*, *J. Biol. Chem.* **159**, 291 (1945).
- 29) Stamm Nr. 8042 der American Type Culture Collection.
- 30) *L. R. Hac*, *E. E. Snell* und *R. J. Williams*, *J. Biol. Chem.* **159**, 273 (1945).
- 31) Stamm Nr. 8014 der American Type Culture Collection.
- 32) *H. E. Sauberlich* und *C. A. Baumann*, *J. Biol. Chem.* **177**, 545 (1949).
- 33) Stamm Nr. 8081 der American Type Culture Collection.
- 34) *M. S. Dunn*, *S. Shankman*, *M. N. Camien*, *W. Frankl* und *L. B. Rockland*, *J. Biol. Chem.* **156**, 703 (1944).
- 35) Stamm Nr. 8042 der American Type Culture Collection.