

# Untersuchungen über die wachstumsfördernde Wirkung einiger natürlicher Extrakte auf *Ustilago violacea* (Pers.) Fuck.

Autor(en): [s.n.]

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft in Bern**

Band (Jahr): **7 (1950)**

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-319449>

## **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.

PETER AMSLER

## Untersuchungen über die wachstumsfördernde Wirkung einiger natürlicher Extrakte auf *Ustilago violacea* (Pers.) Fuck.

(Aus dem botanischen Institut und Garten der Universität Bern)

### I. Einleitung und Fragestellung

#### a) Ernährungsbedingungen für *Ustilago violacea*

*Ustilago violacea* (Pers.) Fuck., der Antherenbrand der *Caryophyllaceae Melandrium*, weist in seinem Entwicklungsgang zwei Phasen auf:

die haploiden, getrenntgeschlechtlichen Sporidienmyzelien leben saprophytisch und haben keinerlei parasitische Fähigkeiten;

erst das aus der Plasmogamie hervorgehende dikaryotische Myzel ist imstande, Wirtspflanzen zu befallen (13), in deren Antheren dann die Brandsporen zur Ausbildung gelangen. Die weiblichen *Melandrium*-pflanzen werden durch den Pilz zur Entwicklung von Staubblättern ange-regt, womit auch hier die Vorbedingungen zur Brandsporenbildung gegeben sind (Abb. 1—4).

Die ersten Versuche, *Ustilagineen* auf künstlichem Substrat zu züchten gelangen B r e f e l d (8, 9). Als Milieu verwendete er Mist- und Pflanzendekokte und fand, daß die Pilze mindestens in ihrer Sporidien-generation beliebig lang saprophytisch leben und sich vegetativ vermehren können. Auch Kopulationen und Bildung von dikaryotischem Myzel wurden beobachtet.

Die Eignung bestimmter Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen für die Ernährung eines Brandpilzes in rein synthetischem Milieu wurde erst von S c h o p f e r und B l u m e r untersucht. Ihre Hauptarbeiten (5, 6, 36, 40), deren Ergebnisse hier kurz wiedergegeben werden sollen, beziehen sich auf eingeschlechtige Sporidienkulturen des von Baarn bezogenen Stammes: *Ustilago violacea* (Pers.) Fuck., f. sp. *Melandrii rubri* (*Lychnidis dioicae* [d. C.] Liro).

Blumer (5) fand zunächst, daß in einer einfachen Nährlösung, enthaltend Magnesiumsulfat, sekundäres Kaliphosphat und l-Asparagin (entspr. der nach Schopfer modifizierten Coon'schen Nährlösung) einzig mit Saponin als Kohlenstoffquelle ein einigermaßen gutes Wachstum des Pilzes erzielt werden konnte. Mit einem mehrmals gereinigten Saponinpräparat dagegen blieb die Entwicklung nahezu vollständig aus, woraus geschlossen wurde, daß die wachstumsfördernde Wirkung des Handelssaponins auf Spuren einer Verunreinigung beruhe.

Schopfer (36) stellte dann fest, daß bei Zugabe von Aneurin oder seiner beiden Komponenten, Pyrimidin und Thiazol, zu derselben einfachen Nährlösung mit Glukose als Kohlenstoffquelle ein normales Wachstum von *Ustilago violacea* erreicht werden kann. Das schlechte Gedeihen des Pilzes auf vitaminfreier Nährlösung beruhte also auf seiner teilweisen Auxoheterotrophie. Die von Blumer vermutete Verunreinigung könnte demnach wenigstens zum Teil aus Aneurin bestehen; ein direkter Nachweis dieses Vitamins im benutzten Saponin gelang allerdings nicht mit Sicherheit (40).

Als total oder partiell auxoheterotroph wird ein Organismus bezeichnet, der die Fähigkeit zur Synthese der für ihn lebensnotwendigen Wirkstoffe ganz oder teilweise verloren hat (Schopfer). *Ustilago violacea* benötigt für seine Entwicklung das Vitamin B<sub>1</sub>; das Synthesevermögen des Pilzes ist auf die letzte Stufe — Pyrimidin + Thiazol → Aneurin — beschränkt. Mindestens die genannten Komponenten müssen daher zusammen im Nährmilieu zur Verfügung stehen; der Organismus ist dann imstande, sie auf enzymatischem Wege zu B<sub>1</sub> zu kondensieren. Der Grad der Aneurinheterotrophie gleicht somit demjenigen von *Phycomyces Blakesleeanus* und *Staphylococcus aureus* (39).

Man könnte sich fragen, ob der Verlust des Synthesevermögens für Pyrimidin und Thiazol auf die Angewöhnung von *Ustilago violacea* an parasitische Lebensweise zurückzuführen sei. Zahlreiche Unterarten der Sammelgruppe *Ustilago violacea* weisen nämlich ziemlich übereinstimmende Aneurinheterotrophie auf. Verwandte Arten, die ebenfalls ihre Brandsporen in den Antheren der Wirtspflanze ausbilden, verhalten sich sehr ähnlich (*U. pingiculae*, *vinosa*) oder benötigen sogar das ganze B<sub>1</sub>-Molekül (*U. scabiosae*) (6,7). Andererseits gibt es völlig auxoautotrophe Brandpilze mit ebenso ausgeprägter



Abb. 1

Normale männliche (links) und weibliche (rechts) Blüte von *Melandrium album* (Mill.) Gar.



Abb. 2

Blüten von *Melandrium album* nach Entfernung des Perianth  
 Gesunde Antheren und Fruchtknoten mit Narben (links und Mitte)  
 Durch *Ustilago violacea* bei einer weiblichen Blüte  
 verursachte Ausbildung von Antheren, die mit Brandsporen angefüllt sind;  
 Fruchtknoten und hauptsächlich Narben verkümmert (rechts)



Abb. 3

Kranke (links) und gesunde (rechts), aufgeschnittene, weibliche Blüten von *Melandrium album*. In der vom Pilz befallenen Blüte die voll ausgebildeten, mit Brandsporen angefüllten und schwarz stäubenden Antheren. Fruchtknoten und hauptsächlich Narben in der Entwicklung gehemmt

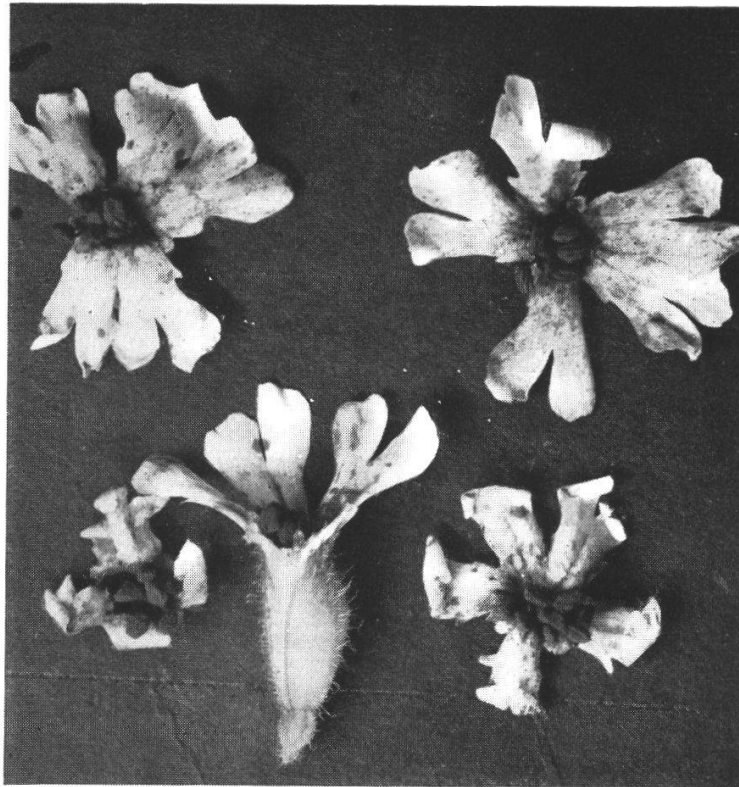
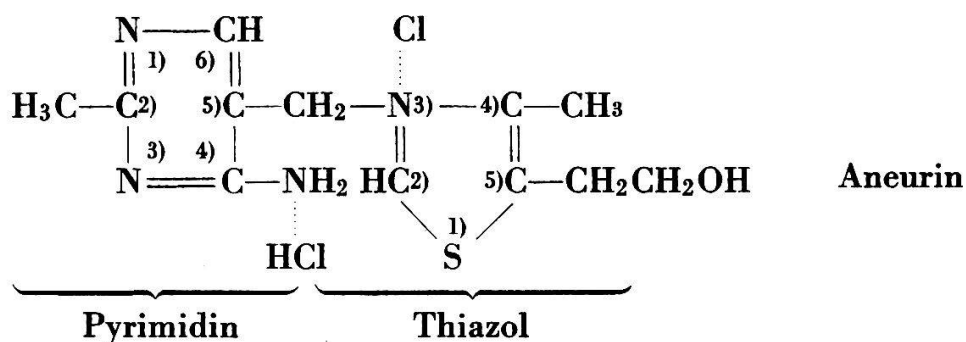


Abb. 4

Männliche Blüten von *Melandrium album* mit brandigen Antheren  
(Aufnahmen von Prof. Dr. W. H. Schopfer, 1937)

parasitischer Aggressivität wie die vorgenannte Gruppe (z. B. *U. zeae*). Es wäre deshalb wohl verfrüht, die Auxoheterotrophie unbedingt als ein Kriterium des Parasitismus anzusprechen.

Versuche, die zusammen gleich wie Aneurin wirkenden Komponenten, 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidin und 4-methyl-5-hydroxyäethylthiazol durch Substitutionsprodukte zu ersetzen, blieben ohne Erfolg (Schopfer und Blumer 40).



Mesoinositol, Nicotinsäure und Lactoflavin waren ebenfalls unwirksam. Mit sehr hohen Pantothen Säuredosen wuchs der Pilz nur schwach.

Aneurin, d. h. die genannten Komponenten, wurden deshalb als wichtigste Wachstumsfaktoren für *Ustilago violacea* angesprochen.

Gerhardt bestritt später diese Auxoheterotrophie von *Ustilago violacea* (12). Werde in der Nährlösung Pektin verwendet, das für den Pilz als spezifische Kohlenstoffquelle gelten könne, so sei eine Entwicklung auch ohne B<sub>1</sub> möglich.

### b) Fragestellung

Im Laufe ihrer Untersuchungen stellten Schopfer und Blumer mehrmals fest, daß bei Zugabe von nur geringen Mengen natürlicher Extrakte (aus Blättern, Stengeln, Keimlingen) zur synthetischen Nährlösung eine wesentlich stärkere Entwicklung von *Ustilago violacea* eintrat als mit optimalen B<sub>1</sub>-Dosen (nach persönlicher Mitteilung).

Aehnliche Erscheinungen wurden auch für andere Organismen beschrieben, z. B. von Williams und Mitarb. (53) für *Saccharomyces cerevisiae*: mit den günstigsten Kombinationen synthetischer Nähr- und Wirkstoffe war die Wirkung von Leberextrakt nicht erreichbar.

Für uns stellte sich die Frage, worauf das stärkere Wachstum von *Ustilago violacea* auf Extrakten gegenüber den Kontrollen auf rein synthetischem Milieu beruhe.

Die der normalen Nährlösung beigefügten Extraktmengen waren im allgemeinen sehr gering; eine plastische oder energetische Wirkung schien uns auch deshalb wenig wahrscheinlich, weil die vom Pilz bevorzugten Kohlen- und Stickstoffquellen in der Nährlösung bereits im Ueberfluß vorhanden waren.

Die Arbeitshypothese, daß neben dem Aneurin in den Extrakten andere bekannte oder unbekannt e echte Wachstumsfaktoren oder mineralische Katalysatoren (Spurenelemente oligosynergistischer Natur) wirksam seien, führte zu folgendem Untersuchungsplan:

1. Abklärung und Ergänzung bestehender Angaben: optimale Aneurindosis, Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration, Pektin als «spezifische» Kohlenstoffquelle;
2. Vergleich einiger wässeriger Extrakte, Untersuchung der Wirkung von *Ustilago violacea*-Extrakten auf diesen Pilz selbst;
3. Versuche mit Aschen der Extrakte und künstlichen Spurenelementmischungen;
4. Prüfung möglichst vieler bekannter Wirkstoffe, einzeln und in Kombinationen auch mit mineralischen Katalysatoren;
5. Behandlung der Extrakte, um wenn möglich das wirksame Prinzip anzureichern und durch geeignete Reaktionen zu charakterisieren.

## 2. Grundversuche

### a) Methodik

Alle Untersuchungen führten wir mit dem von Schopfer und Blumer verwendeten Stamm von *Ustilago violacea* (aus Baarn) durch. Der Pilz bildet in Nährlösung am Boden des Gefäßes eine lockere Schicht weißlicher, mehr oder weniger zusammenhängender Sproßzellen, wobei zeitweise kleine Klumpen auftreten können. Beim Aufrühren der Flüssigkeit entsteht eine ziemlich gleichmäßig trübe Suspension, deren Lichtabsorption ungefähr dem gebildeten Trockengewicht des Pilzes proportional ist (5).

Die Kulturen wurden in 150 ccm Erlenmeyerkolben in je 25 ccm der bereits erwähnten Schopfer'schen Nährlösung gezogen, die trotz ihrer Einfachheit in der Wirkung von anderen Kombinationen nicht übertroffen wurde (40).

Nährlösung:	Glukose	1	‰	} in dest. Wasser (aus Pyrex-Glas)
	Asparagin	0,1	‰	
	MgSO <sub>4</sub>	0,05	‰	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15	‰	
	+ Aneurin			

Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven während 20 Minuten bei 115° C. Sämtliche Zusätze — Extrakte, Wirkstoffe, Aschen usw. — wurden getrennt sterilisiert und erst nachher zugegeben, um schädliche Reaktionen zu vermeiden.

Zur Herstellung der Impfsuspension entnahmen wir einer Stammkultur auf Bierwürzeagar ein Stücklein Myzelbelag und brachten es zur Weiterentwicklung in normale Nährlösung. Nach mindestens 10, spätestens 20 Tagen, wurde diese Kultur dreimal steril ausgewaschen; die in Wasser aufgenommene Sporidienmasse ergab die Impfsuspension, von der pro Kultur zwei Tropfen geimpft wurden. Durch dieses Vorgehen sollte ein möglichst geringer Gehalt an mitgeschleppten Stoffen (z. B. Aneurin) und gleiches Alter des Impfmaterials gewährleistet werden.

Die Kulturdauer betrug gewöhnlich 15—18 Tage. Zur Messung des Wachstums verwendeten wir anfänglich ein Kolorimeter nach Lange, das die Trübungswerte angab (nephelometrische Werte).

Dann führten wir eine Zeitlang Trockengewichtsbestimmungen durch, indem wir die Kulturen auf abgewogenen Filtrierpapierscheiben abnutschten, trockneten und dann wogen. Später stand uns ein „Spekker“-Kolorimeter zur Verfügung, das die durch die Pilzsuspension verursachte Lichtextinktion gegenüber der nicht beimpften Nährlösung angab.

In allen Versuchen wurde eine vollständige B<sub>1</sub>-Konzentrationsreihe als Kontrolle mitgeführt. Die in den Tabellen und graphischen Darstellungen wiedergegebenen Größen (Durchschnitte von mindestens vier Kulturen) stellen Prozentwerte des mit optimaler Aneurindosis (0,2 γ/Kultur) erreichbaren Pilzwachstums dar, so daß ein Vergleich der mit den verschiedenen Methoden gewonnenen Ergebnisse auf alle Fälle möglich ist.

### b) Die optimale B<sub>1</sub>-Dosis

Da diese von Alter und Konzentration des Impfmaterials abhängt (40), war es nötig, die unter unsern Bedingungen optimal wirksame Aneurinkonzentration festzustellen. In Fig. 1 sind den gewichtsmäßig ermittelten Ergebnissen noch die Extinktionswerte aus einem ungefähr zwei Jahre später durchgeführten Versuch beigelegt. Die Resultate stimmen recht gut überein. Der Grad der Aneurinheterotrophie des verwendeten Stammes von *Ustilago violacea* veränderte sich demnach im Verlaufe des genannten Zeitraumes nicht. Das Optimum der B<sub>1</sub>-Konzentration (0,2 γ/Kult.) lag aber höher als in den Versuchen von Schopfer und Blumer (0,1 γ/Kult.).



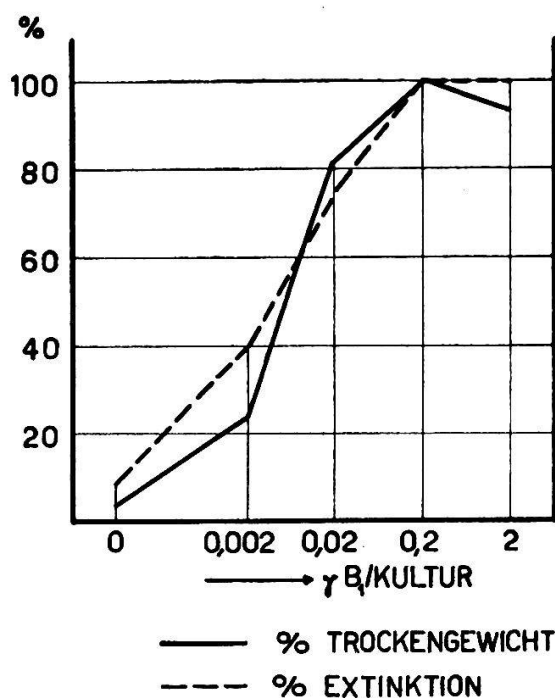


Fig. 1

Wirkung verschiedener Aneurin-Konzentrationen auf das Wachstum von *Ustilago violacea* (Kulturdauer: 16 Tage)

### c) Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration

Aus Untersuchungen von Ranker (29) geht hervor, daß *Ustilago zaeae* auf Nährböden mit pH-Werten von 3—6 ungefähr gleich gut gedeiht. Nach Blumer (5) wuchs *Ustilago violacea* auf ungepufferten Nährlösungen bereits bei pH 3,5—4, bei pH 4,5—6,5 erreichte der Pilz ein Entwicklungsoptimum, und sogar bei pH 8,3 war noch ein schwaches Wachstum möglich. Die starke Ammoniakbildung durch den Organismus verursachte eine anfänglich rasch ansteigende Alkalisierung des Milieus, die später eher wieder abnahm.

Als Ergänzung zu den genannten Beobachtungen untersuchten wir den Einfluß verschiedener, mit dem Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer nach McIlvaine eingestellter pH-Werte auf das Wachstum von *Ustilago violacea*.

Um eine Nebenwirkung der zusätzlich in die Nährlösung gebrachten Salze möglichst auszuschalten, wurde der Puffer so verdünnt, daß er nach dem sterilen Zusammengießen mit der Nährlösung bloß noch eine Konzentration von 1 : 20 aufwies. In einem Vorversuch hatte sich die so erreichbare Pufferkapazität als groß genug erwiesen.

Die Ergebnisse, zusammengestellt in Fig. 2, bestätigen die weitgehende Unempfindlichkeit von *Ustilago violacea* gegenüber pH-Änderungen im Bereich von 3,2—6. Das Optimum lag bei pH 4,6, während oberhalb des Neutralpunktes das Wachstum stark gehemmt war. Die von Schopfer und Blumer angegebene Nährlösung (40) mit einem mittlern pH von 4,6 kann also auch in bezug auf die Wasserstoffionenkonzentration als günstig gelten.

Auffällig ist, daß im gepufferten Milieu bei geringer  $B_1$ -Konzentration eine Förderung, bei hoher  $B_1$ -Dosis eine leichte Hemmung gegenüber den Kontrollen erfolgte. Das dürfte durch Begleitstoffe der verwendeten Zitronensäure verursacht worden sein.

In den weiteren Versuchen wurde das pH nach Zugabe der Extrakte zur Nährlösung stets kontrolliert. Es lag immer zwischen den Werten 4—5,5. Demnach kann die pH-Beeinflussung durch die Extrakte vernachlässigt werden.

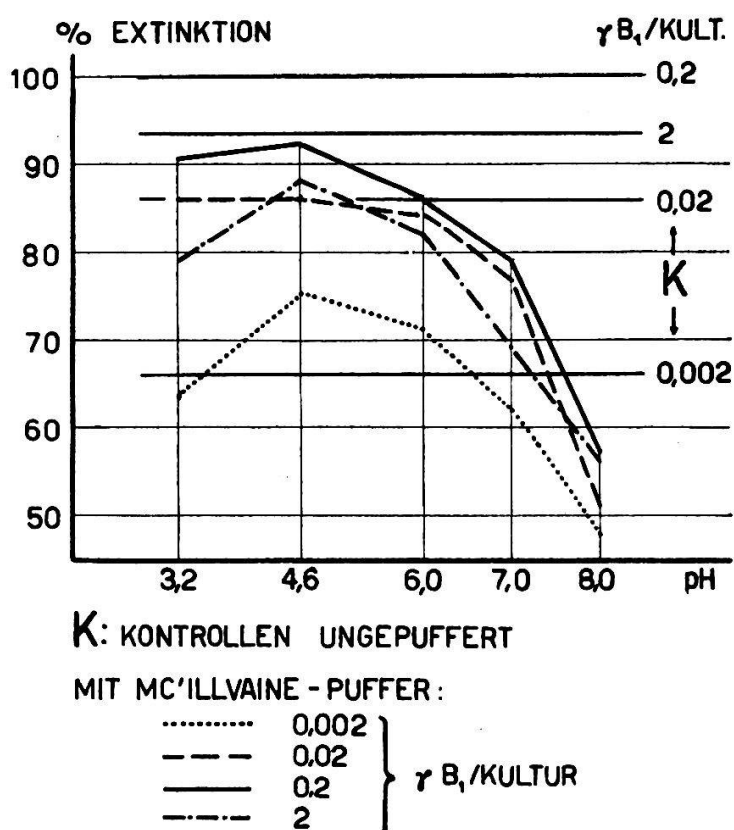


Fig. 2

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Wachstum von *Ustilago violacea*  
(Kulturdauer: 13 Tage)

*d) Pektin als Kohlenstoffquelle*

Bei verschiedenen phytoparasitischen Pilzen (z. B. *Phytophthora*) konnte die Ausscheidung von Pektinasen, durch die das Pektin in den Mittellamellen von Zellwänden abgebaut wird, nachgewiesen werden (22).

Gerhardt (12) machte ähnliche Beobachtungen bei Kulturen von *Ustilago avenae* und *zaea* auf Rübenschnitzeln. Er nahm an, daß diese Pilze die freiwerdenden Pektinstoffe verwerten können. Im Anschluß an die Arbeiten von Schopfer und Blumer unternahm er auch Versuche mit *Ustilago violacea* (Stamm aus dem Botan. Institut der Universität Bern). Er züchtete den Organismus auf pektinhaltiger aber «vitaminfreier» Nährlösung. Das verwendete Pektin («Merck» für wissenschaftliche Zwecke) war zur Entfernung von möglicherweise vorhandenem Aneurin dreimal mit Alkohol ausgeschüttelt worden. Mit Glukose (vitaminfrei) blieb die Entwicklung nahezu vollständig aus, während mit Pektin reiches Wachstum erfolgte. Dieses Ergebnis schien die Vermutung von Gerhardt zu bestätigen, daß Pektin allen von Schopfer und Blumer untersuchten Verbindungen als C-Quelle für *Ustilago violacea* überlegen sei. Der Pilz hätte sich demnach in Gegenwart von Pektin auxoautotroph verhalten und B<sub>1</sub> selbst synthetisiert.

Nach den Erfahrungen von Blumer mit Saponinen (5) schien es aber fraglich, ob die von Gerhardt durchgeführte Reinigung des Pektins genügte. Wir prüften deshalb verschiedene Pektinpräparate mit Hilfe des *Phycomces*-Wachstumstestes nach Schopfer (35) auf ihren Gehalt an Aneurin.

Tab. 1. B<sub>1</sub>-Gehalt verschiedener Pektinpräparate

Präparat	γ B <sub>1</sub> pro g Trockensubstanz
1. Pektin „Merck“ für wissenschaftliche Zwecke, 1 Std. mit 95 %igem Aethanol ausgeschüttelt .....	0,5
2. 10 g von 1. in 100 ccm Wasser gelöst, mit 3 g Carbo med. „Merck“ bei 70° C. behandelt, Filtrat eingedampft .....	0,15
3. „Sandoz“-Reinpektin H, unbehandelt .....	0,15
4. „Sandoz“-Reinpektin R, unbehandelt .....	0,12

Aus Tab. 1 ist deutlich ersichtlich, daß das mit Alkohol behandelte Pektin «Merck» im Gegensatz zur Annahme von Gerhardt noch beträchtliche Mengen an Vitamin B<sub>1</sub> enthält, die selbst durch Kohlebehandlung nicht vollständig beseitigt werden konnten. Sie genügen jedenfalls, um in 1 %iger Pektinlösung auch ohne Zusatz von Aneurin ein optimales Wachstum von *Ustilago violacea* zu gewährleisten.

Wir wiederholten den Versuch nach Gerhardt mit Pektin «Merck» und Glukose, fügten aber der Nährlösung noch B<sub>1</sub> in verschiedenen Konzentrationen bei. Die Prozente der Nephelometerwerte (Kulturdauer 21 Tage) sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2. Wachstum von *Ustilago violacea* auf Glukose und Pektin «Merck» (Präp. 1 von Tab. 1)

$\gamma$ B <sub>1</sub> /Kultur	1 % Glukose	1 % Pektin
0	1,7	80
0,002	16	86,7
0,02	88,3	83,3

In einem erweiterten Versuch mit einer Mischung von gleichen Teilen «Sandoz»-Reinpektin H und R (Präp. 3 und 4 d. Tab. 1) wurden noch Kulturdauer und Stickstoffgehalt der Nährlösung berücksichtigt (Fig. 3).

Beide Versuche zeigen deutlich, daß die Pektine «Merck» und «Sandoz» keine für *Ustilago violacea* spezifische Wirkung als Kohlenstofflieferanten ausüben. Glukose kann deshalb nach wie vor als eine der günstigsten Kohlenstoffquellen für diesen Pilz gelten.

Die wachstumsfördernde Wirkung der benutzten Pektine in aneurinfreier Nährlösung beruht auf wirkstoffartigen Verunreinigungen. Wie gezeigt wurde, ist eine davon das B<sub>1</sub>. Möglicherweise sind noch andere Faktoren im Handelspektin vorhanden, die hauptsächlich auch zu Beginn die Entwicklung von *Ustilago violacea* fördern (s. Fig. 3). Schopfer beobachtete 1934 bei *Phycomyces Blakeleanus* ein ähnliches vorübergehendes Mehrwachstum (gegenüber Kontrollen mit B<sub>1</sub> allein) verursacht durch Weizenkeimextrakt. Es zeigte sich dann, daß Hypoxanthin als Zusatzwachstumsfaktor dafür verantwortlich war (15,

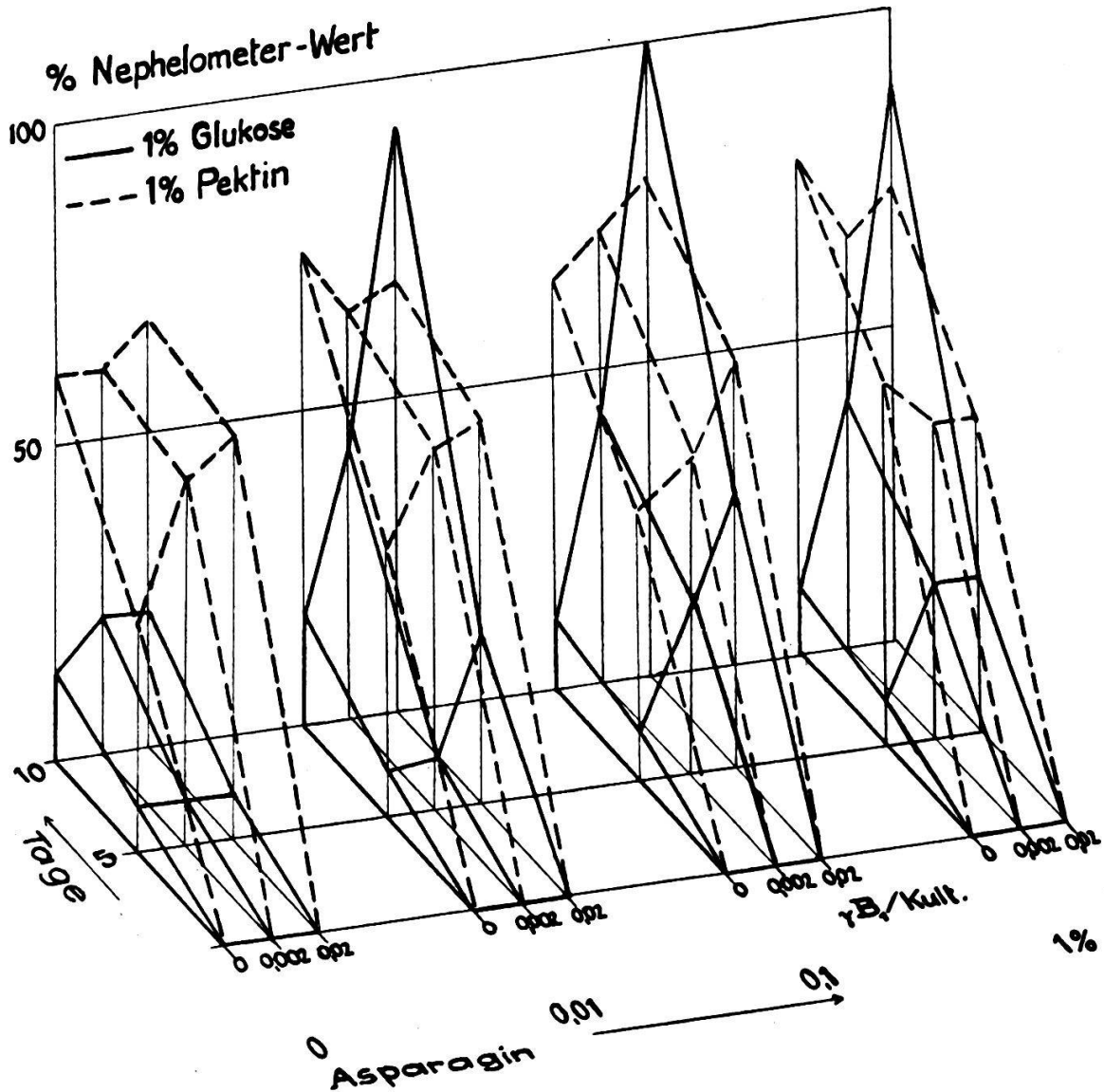


Fig. 3

Wachstum von *Ustilago violacea* mit Glukose oder Pektin als C-Quelle

31, 33). *Ustilago violacea* reagierte in unsern Versuchen nicht auf Hypoxanthinzusätze (s. auch Kap. 5).

Eigenartig scheint das gute Gedeihen des Pilzes auf Pektin bei fehlender N-Quelle. Man muß annehmen, daß im verwendeten Pektin genügende Mengen assimilierbarer Stickstoffverbindungen vorhanden waren.

Im Gegensatz zu gewissen Schlüssen von Gerhardt, bestätigen die geschilderten Befunde, daß der verwendete Stamm von *Ustilago violacea* in Gegenwart von Pektin als C-Quelle gegenüber Aneurin ebenso heterotroph ist wie in Nährlösungen mit Glukose.

### 3. Untersuchungen mit verschiedenen Extrakten

#### a) Vergleich einiger natürlicher Extrakte

Es sollten einige natürliche, wässrige Extrakte in ihrer wachstumsfördernden Wirkung auf *Ustilago violacea* miteinander verglichen und so geeignetes Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen gefunden werden.

Bierwürze, Weizenkeim-, Hefe- und Leberextrakt wurden gewählt wegen ihres hohen Gehaltes an Wirkstoffen; dazu kamen noch Dekokte von *Melandrium album*- und von *Spinacia oleracea*-Blättern, sowie von Kuhmist. Mit Auszügen aus Blättern der spezifischen Wirtspflanze unseres Pilzes — *Melandrium album* — schien uns eine starke Wirkung wahrscheinlich. Spinatblätter waren zur Isolierung von Folsäure verwendet worden (24); ein wäßriger Absud aus ihnen sollte nach Blumer (5) erheblich wirksamer sein als Melandriumblattextrakt. Kuhmist war als wirkstoffreiches Verdauungsprodukt von gewissem Interesse.

Die Extrakte wurden folgendermaßen zubereitet:

#### Weizenkeimextrakt:

Weizenkeimlinge gemahlen (Minoterie de Plainpalais, Genève) und pulverisiert, mit Petroläther entfettet, getrocknet bei 105° C., mit 75%igem Aethanol im Soxhlet während 48 Std. extrahiert, Alkohol im Vakuum entfernt, Rückstand in Wasser gelöst:

WKE 11 1 ccm entspr. 1 g entfett. Weizenkeimlingen;

Trockengehalt: 123,9 mg/ccm.

#### Extrakte von

*Spinacia oleracea* (Blatt), Trockengehalt: 85 mg/ccm;

*Melandrium album* " " 43,2 "

Trockenhefe, " " 27,5 "

Kuhmist, " " 80,4 "

Bei 80° getrocknetes Material pulverisiert, mit der 10fachen Menge Wasser 1/4 Std. im Autoklav bei 115° C. extrahiert, zentrifugiert und filtriert; Filtrat im Vakuum eingengt, so daß 1 ccm Extrakt 1 g Trockenmaterial entsprach.

#### Bierwürze:

Unverändertes Trockenprodukt,

Trockengehalt: 241 mg/ccm.

#### Leberextrakt:

Verdünntes Präparat der Fa. Hoffmann-La Roche,

Trockengehalt: 250 mg/ccm.

Von diesen Extrakten wurden steigende Dosen allein und in Kombinationen mit verschiedenen B<sub>1</sub>-Mengen (s. Fig. 4) dem Nährmilieu zugesetzt.

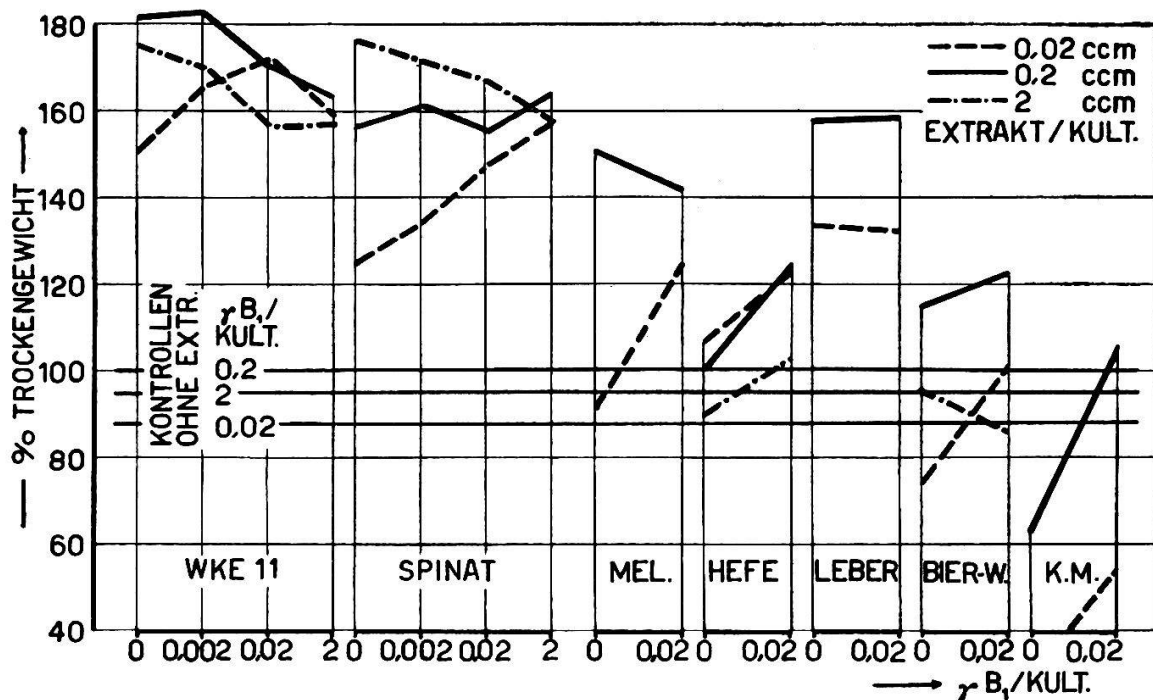


Fig. 4

Wirkung natürlicher Extrakte auf das Wachstum von *Ustilago violacea*  
(Kulturdauer: 16 Tage)

Extrakte aus Weizenkeimlingen (WKE 11), Spinat, Melandrium-Blätter (Mel.), Hefe, Leber, Kuhmist (K. M.) und Bier-Würze (Bier-W.)

Wie aus Fig. 4 ersichtlich ist, gedieh *Ustilago violacea* auch ohne Aneurin in Gegenwart der Extrakte recht gut, was auf deren z. T. sehr hohen Gehalt an diesem Vitamin beruht (19, 21, 50). Bei Weizenkeim-, Spinat-, Melandriumblatt- und Leber-Extrakt ging das Pilzwachstum 40—80 % über das mit B<sub>1</sub> erreichbare Optimum hinaus. Das kann nicht bloß durch eine erhöhte Menge dieses Vitamins verursacht worden sein. Wurde nämlich noch Aneurin zugesetzt, so wurde die wachstumsfördernde Wirkung bei geringen Extraktmengen wohl etwas verstärkt, bei größern dagegen erheblich herabgesetzt. Wie in Kulturen mit reinem Vitamin wirkte sich also eine Ueberdosierung hemmend aus. Man muß deshalb annehmen, daß die genannten Extrakte noch ein zusätzlich zu B<sub>1</sub> wirksames Prinzip enthalten, durch welches das auffällige Mehrwachstum von *Ustilago violacea* ausgelöst wird.

In Uebereinstimmung mit den Ergebnissen von Blumer (5) war der Extrakt aus Melandrium-Blättern weniger wirksam als derjenige aus Spinat. Bierwürze förderte das Wachstum des Pilzes nicht besonders stark; hier zeigte sich die Wirkung einer Ueberdosierung an B<sub>1</sub> sehr deutlich (Verlauf der Kurve mit 2 ccm Extrakt).

Beim Hefeextrakt nahm die Aktivität auch ohne zugefügtes Aneurin mit steigender Konzentration ab. Es wäre denkbar, daß auch *Ustilago violacea* durch gewisse Hefesubstanzen gehemmt wird, ähnlich wie das nach Cook et al. (10) für *Aspergillus niger* der Fall sein soll. Der Kuhmistabsud allein verursachte nur geringes Pilzwachstum. Die Wirkung von zugefügtem B<sub>1</sub> wurde verglichen mit den Kontrollen bei der geringsten Extraktmenge am stärksten herabgedrückt, möglicherweise durch antivitaminotische Stoffe.

Für unsere weiteren Versuche wählten wir Weizenkeim- und Spinatextrakt, da durch sie die Entwicklung von *Ustilago violacea* am stärksten gefördert wurde.

#### b) Wirkung von Eigenextrakten auf *Ustilago violacea*

Es stellte sich die Frage, ob Extrakte von *Ustilago violacea* auf diesen Pilz stärker wachstumsfördernd wirken, wenn die extrahierten Pilzzellen auf einer Nährlösung mit Weizenkeim- oder Spinatextrakt statt nur mit B<sub>1</sub> gewachsen waren. Wäre das der Fall, so könnte man daraus schließen, daß sich die «Extraktzellen» von den «B<sub>1</sub>-Zellen» durch einen oder mehrere aus den Extrakten aufgenommene und gespeicherte Wirkstoffe unterscheiden. Man müßte dann auch annehmen, daß ein Absud von «Extraktzellen» in geeigneter Konzentration das Wachstum von *Ustilago violacea* ebenso stark fördern würde wie die Extrakte selbst; «B<sub>1</sub>-Zellen»-Dekokt dagegen würde nur eine geringe Wirkung ausüben.

Wir legten je 50 Kulturen von *Ustilago violacea* an, mit Weizenkeimextrakt (WKE 11, 0,2 ccm/Kult.), Spinatblattextrakt (2 ccm/Kult.) oder B<sub>1</sub> (0,2  $\gamma$ /Kult., optimale Dosis). Nach 20 Tagen wurden die auf gleichem Milieu gezogenen Pilzzellen zusammengewaschen, mehrmals ausgewaschen und zentrifugiert und die drei so erhaltenen Pilzmassen über Phosphorpentoxyd getrocknet. Je 0,3 g des trockenen pulverisierten Materials wurden dann mit je 60 ccm Wasser 20 Minuten bei 115° im Autoklaven extrahiert. Von den drei Präparaten (ausgeglichen auf 3 mg Trockengehalt pro ccm) setzten wir Mengen von 0,1 und 1 ccm (pro Kultur) kombiniert mit verschiedenen B<sub>1</sub>-Dosen der Nährlösung zu (Fig. 5).

Schopfer und Blumer fanden, daß *Ustilago violacea*-Extrakte (Pilzzellen auf gewöhnlicher Nährlösung + B<sub>1</sub> gezüchtet) sowohl bei diesem Pilz selbst wie bei *Phycomyces Blakesleeanus* ein gewisses Wachstum ermöglichten. Sie nahmen an, daß die der Nährlösung beigefügten Wuchsstoffe von *Ustilago* aufgenommen und gespeichert wurden. Es schien auch nicht ausgeschlossen, daß die Pilzextrakte noch



andere auf *Ustilago violacea* wirksame Wuchsstoffe oder sogar Hemmstoffe enthielten (40).

Der Versuch ergab, daß ein Absud von *Ustilago*-Zellen, die sich in bloß B<sub>1</sub>-haltiger Nährlösung entwickelt hatten, erheblich weniger wachstumsfördernd wirkte als Dekokte von Pilzzellen, die in einem Milieu mit Weizenkeim- oder Spinatextrakt gewachsen waren. Diese vermochten aber (selbst in Kombinationen mit B<sub>1</sub>) die Entwicklung von *Ustilago violacea* kaum über das mit Aneurin allein erreichbare Optimum hinaus zu steigern. Da durch Beifügen dieses Vitamins der Auszug aus «B<sub>1</sub>-Zellen» fast ebenso wirksam gemacht werden konnte wie die «Extraktzellen»-Dekokte, muß man annehmen, daß diese sich von jenen bloß durch einen höhern B<sub>1</sub>-Gehalt unterscheiden. Vielleicht wird der Pilz durch Substanzen aus dem Weizenkeim- oder Spinatextrakt in den Stand gesetzt, mehr Aneurin in sein Fermentsystem einzubauen, als ihm das auf rein synthetischer Nährlösung möglich ist. Er wäre damit in der Lage, mehr Nährstoffe zu verarbeiten und sich auch deshalb in einem Milieu mit natürlichen Stoffen stärker zu entwickeln.

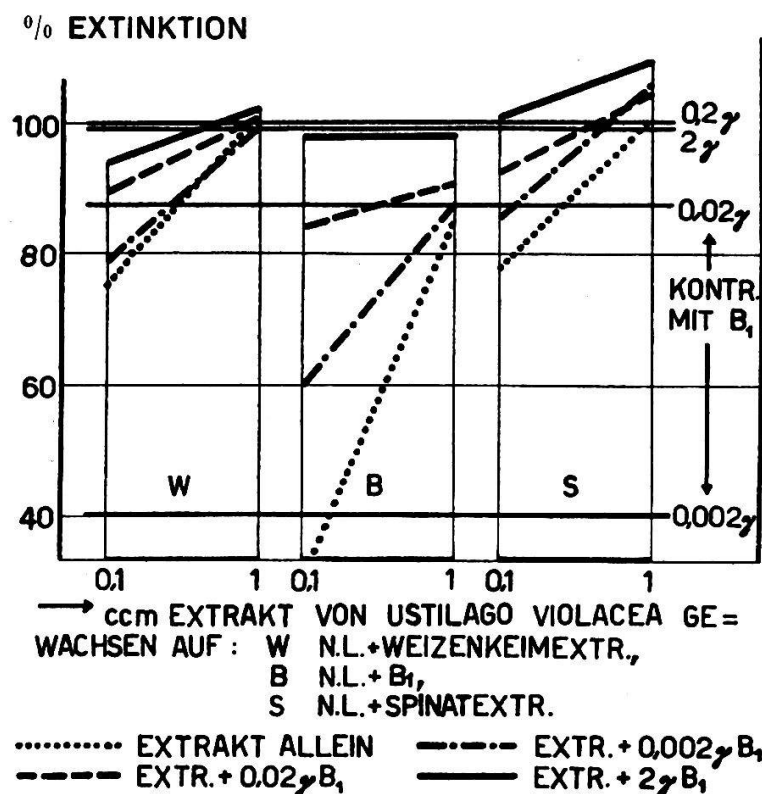


Fig. 5

Wirkung von Eigenextrakten auf *Ustilago violacea* (Kulturdauer 16 Tage)

Im Gegensatz zu der geäußerten Annahme hatten also die «Extraktzellen» entweder aus der Nährlösung (mit Spinat- und Weizenkeimextrakt) keine zu  $B_1$  zusätzlich wirksamen Stoffe aufgenommen oder sie inaktiviert. Hemmstoffe wurden durch den nur in synthetischer Nährlösung gewachsenen Pilz wohl kaum gebildet, denn sonst hätten die daraus bereiteten Extrakte das Wachstum von *Ustilago violacea* mit zunehmender Konzentration nicht stärker fördern können.

Wenn der Versuch auch nicht den erwarteten Verlauf nahm, so bildet er doch eher eine Bestätigung dafür, daß die überaus starke Wachstumsförderung von *Ustilago violacea* durch Weizenkeim- und Spinatextrakt nicht bloß auf einer Nährstoffwirkung beruht.

#### 4. Extrakt-Aschen und Spurenelementmischungen

(Pseudowachstumsfaktoren mineralischer Natur)

Als Pseudowachstumsfaktoren gelten mineralische Substanzen, hauptsächlich Metalle (z. B. Mn, Zn), die in sehr geringen Mengen (als Spurenelemente) eine biokatalytische Wirkung ausüben vermögen (39). Eine scharfe Abgrenzung zu den gewöhnlichen Nährsalzen läßt sich nicht immer angeben.

Selbst reinste Nährlösungen enthalten stets derartige Spurenelemente: Verunreinigungen der einzelnen Bestandteile der Lösung und Substanzen, die aus den Gefäßwänden herausgelöst werden. Diese oligosynergistisch wirksamen Stoffe (*Javillier*) sind wohl für das Wachstum von Mikroorganismen unentbehrlich; es ist nicht ausgeschlossen, daß in einem wirklich nur die wenigen bekannten Komponenten enthaltenden Milieu überhaupt keine Entwicklung möglich wäre. Sie kann aber durch Zusätze geringer Dosen geeigneter Salzlösungen oft erheblich gesteigert werden; gelegentlich wird durch Beifügen von Spurenelementen die Ausnützung gewisser Nährstoffe erst möglich gemacht (z. B. bei der Symbiose *Mucor Ramannianus* - *Rhodotorula rubra* [49]).

##### a) Extrakt-Aschen

Von WKE 11, WKE 13 (Präp. s. Kap. 3 und 6) und Spinatextrakt wurden je 5 ccm (entspr. 5 g trockener Ausgangssubstanz) in Platintiegeln geglüht, bis die Bodenbeläge weiß waren. Die Rückstände wurden mit etwas HCl herausgelöst, dann neutralisiert und mit Wasser so verdünnt, daß 1 ccm der Aschenlösung 0,2 ccm Ausgangsextrakt entsprach. Die Aschenlösungen enthielten pro ccm an mineralischer Substanz:

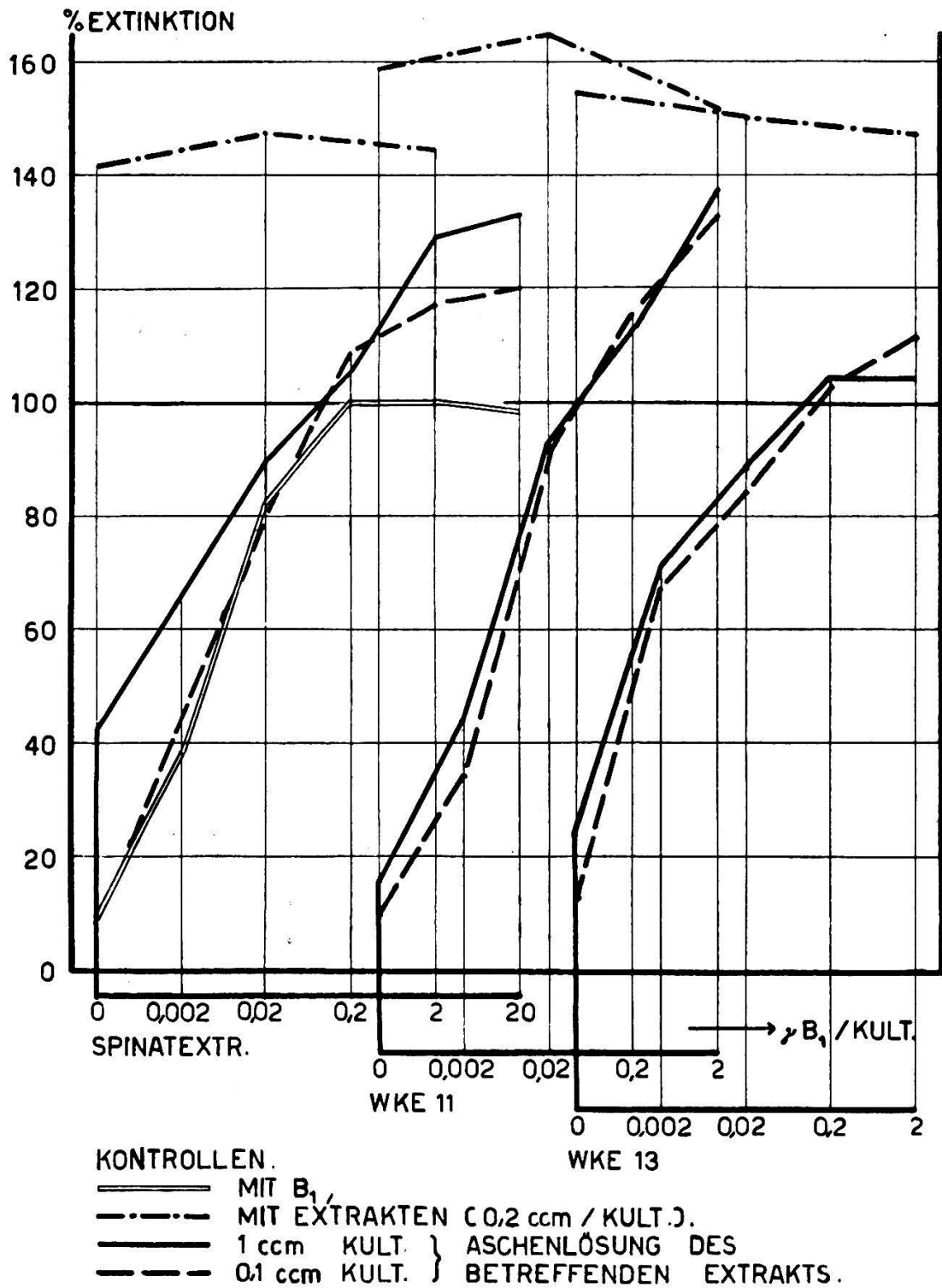


Fig. 6

Wirkung von Extrakt-Aschen auf das Wachstum von *Ustilago violacea*  
(Kulturdauer: 16 Tage)

A. L. aus Spinatextrakt	2,3 mg
„ „ WKE 11	1,2 „
„ „ WKE 13	0,8 „

Davon wurden pro Kultur 0,1—1 ccm in Kombinationen mit verschiedenen B<sub>1</sub>-Dosen zugesetzt. Die Kontrollen mit B<sub>1</sub>, Spinat- und Weizenkeimextrakt enthielten entsprechende Mengen der Lösung, mit der die Glührückstände aufgenommen worden waren.

Aus den in Fig. 6 zusammengestellten Ergebnissen geht Folgendes hervor:

Bei Zusatz der Aschen zu B<sub>1</sub>, besonders derjenigen von Spinatextrakt und WKE 11, wurde das Wachstum von *Ustilago violacea* recht beträchtlich über das mit B<sub>1</sub> allein erreichbare Optimum hinaus gefördert (ungefähr um 35 %), allerdings nicht so stark wie durch die vollständigen Extrakte. Es müssen also wohl neben dem Aneurin noch andere organische Substanzen an der Extraktwirkung beteiligt sein. Allein waren die Aschen nahezu unwirksam, was gut übereinstimmt mit Ergebnissen von S c h o p f e r mit *Phycomyces Blakesleeanus* (32), von M o s e r mit *Rhizopus suinus* und *oryzae* (25) und von M ü l l e r mit *Mucor Ramannianus* (26).

Die optimale Aneurindosis war in Gegenwart der Aschen leicht erhöht, d. h. der Synergismus zwischen Aschen und B<sub>1</sub> wirkte sich so aus, daß der Pilz in stande war, auch auf supraoptimale Vitaminmengen noch mit einer Wachstumssteigerung zu reagieren.

Diese Resultate veranlaßten uns, zu prüfen, ob die Aschen von Weizenkeim- und Spinatextrakten nicht durch künstliche Spurenelementmischungen ersetzt werden könnten.

#### b) Künstliche Spurenelementmischungen

Nachdem Raulin (30) bereits 1869 auf die Notwendigkeit von Spurenelementmischungen für das Gedeihen von Pflanzen hingewiesen hatte, wurden von verschiedenen Autoren Untersuchungen über die Wirkung einzelner derartiger Elemente eingeleitet (2, 3, 16). Später wurden dann zusammengesetzte Spurenelementmischungen angegeben, die auf das Wachstum verschiedener Organismen einen günstigen Einfluß haben sollten.

Mit der von H o a g l a n d angegebenen A—Z-Mischung (14) erhielten wir in Versuchen mit *Ustilago violacea* in keinem Falle eine Förderung über das mit optimaler B<sub>1</sub>-Menge erreichbare Wachstum

hinaus. Es werden deshalb in der folgenden Tabelle 3 nur die mit den Mischungen von Steinberg (44, 45) und von Berthelot (1) gefundenen Ergebnisse angeführt.

Tab. 3. Wirkung von Spurenelementen in Mischungen und einzeln auf das Wachstum von *Ustilago violacea*

(Entwicklung ohne Spurenelemente, mit optimaler B<sub>1</sub>-Dosis = 100 %)

γ B <sub>1</sub> /Kultur		0	0,02	0,2	2
		%	%	%	%
Kontrollen ohne Spurenelemente		0	77,1	100	90,4
Steinberg-Mischung	1 ccm/Kult.	8,6	80,9	101,9	97,1
	0,1 ccm/Kult.	11,3	81,9	94,3	100
Berthelot-Mischung	0,05 ccm/Kult.	42,8	90,4	118,2	120,9
	0,005 ccm/Kult.	18,1	80	107,6	112,4
Bestandteile der Berthelot-Mischung entsprechend 0,005 ccm dieses Gemisches pro Kultur	Cu SO <sub>4</sub>	44,7	89,5	113,3	90,4
	Be SO <sub>4</sub>	74,3	100	90,4	82,8
	Zn SO <sub>4</sub>	60,9	80,9	87,6	86,7
	Ca SO <sub>4</sub>	41,8	80,9	95,2	90,4
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	65,7	73,3	91,4	86,7
	Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	40,9	75,2	88,6	79
	Mn SO <sub>4</sub>	40	75,2	98,1	91,4
	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	29,5	63,8	90,4	104,8
	Co Cl <sub>2</sub>	41,8	73,3	90,4	83,8
Ni Cl <sub>2</sub>	42,8	75,2	93,3	90,4	

Die Steinberg-Mischung übte keine zu B<sub>1</sub> zusätzliche Wirkung aus. Die Berthelot-Lösung verursachte eine deutliche Wachstumsförderung, am stärksten bei supraoptimaler B<sub>1</sub>-Menge (wie die Extraktaschen); die Extraktaschen-Werte wurden allerdings nicht erreicht. Von den Bestandteilen bewirkten Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> bei supraoptimaler, CuSO<sub>4</sub> bei optimaler und BeSO<sub>4</sub> bei suboptimaler Aneurindosis mehr oder weniger ausgeprägte Entwicklungssteigerungen. Die übrigen Werte blieben zum Teil erheblich unter den mit B<sub>1</sub> allein erreichbaren (besonders bei Ti<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Hemmwirkung?), mit Ausnahme derjenigen

ohne Vitamin, die allgemein sehr hoch lagen. Diese müssen aber als zufällig angesehen werden, da die entsprechenden Ergebnisse von Versuch zu Versuch variierten.

Die Wirkung der *Berthelot*-Mischung beruht also offenbar auf einem Synergismus der einzeln kaum oder nur schwach wirksamen Spurenelemente, wobei wahrscheinlich dem Cu die Hauptrolle zukommt. Dieses Metall ist in geringen Konzentrationen auch für andere Pilze unentbehrlich, z. B. für *Aspergillus niger* zur Bildung des schwarzen Sporenfarbstoffes und für das Wachstum überhaupt (43, 44). In höhern Konzentrationen wirkt es stark giftig, und es ist nicht ausgeschlossen, daß die *Steinberg*-Mischung wegen ihrer größern Cu-Menge in unsern Versuchen unwirksam war.

## 5. Untersuchungen mit bekannten organischen Wirkstoffen

Da mit Aschenlösungen und Spurenelementmischungen lange nicht eine derart ausgeprägte Förderung des Wachstums von *Ustilago violacea* erreicht werden konnte wie mit den Extrakten, sollten vor weitem Untersuchungen mit Weizenkeim- und Spinatauszügen möglichst viele der bereits bekannten und möglicherweise als Wachstumsfaktoren für Mikroorganismen in Frage kommenden wasserlöslichen organischen Substanzen geprüft werden.

### a) *Pyrimidin und Thiazol*

Bei ihren Untersuchungen über die Spezifität der Wirkung von Pyrimidinen und Thiazolen stellten *Schopper und Blumer* (40) fest, daß die folgenden Derivate allein ein Wachstum von *Ustilago violacea* nicht auszulösen vermögen (s. auch Einleitung):

Pyrimidin und Substitutionsprodukte:

1. 2-methyl-4-amino-5-amino-methyl-pyrimidin, (norm. P.),
2. 2-methyl-4-amino-5-thioformylamino-methyl-pyrimidin,
3. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-pyrimidin,
4. 2-methyl-4-mercapto-pyrimidin,
5. 2,5-dimethyl-4-amino-pyrimidin,
6. 2-methyl-5-carbaethoxy-6-amino-pyrimidin,
7. 2-methyl-4-hydroxy-6-amino-pyrimidin,
8. 2,4-di-hydroxy-pyrimidin:

## Thiazol und Substitutionsprodukte:

10. 4-methyl-5-( $\beta$ -hydroxyaethyl)-thiazol, (norm. Th.),
11. 4-methyl-2-mercapto-thiazol,
12. 4-methyl-thiazol,
13. 4,5-dimethyl-thiazol,
14. 3-benzyl-4-methyl-5-( $\beta$ -hydroxyaethyl)-thiazol,
15. 3-(4' (5')-methyl-imidazol)-4-methyl-5-( $\beta$ -hydroxyaethyl)-thiazol.

Von den Kombinationen war nur die 1+10 ebenso wirksam wie das ganze Aneurinmolekül, aber die Komponenten (normales Pyrimidin und normales Thiazol) mußten verglichen mit dem vollständigen Vitamin in doppelter Konzentration vorhanden sein.

Wir verzichteten auf eine Wiederholung dieser Versuche, prüften dagegen noch das 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidin allein und in Kombinationen mit dem normalen Thiazol. Dieses sind die Spaltstücke, die z. B. bei Einwirkung von Fischgewebeextrakten auf B<sub>1</sub> entstehen (18). Das zerlegende Ferment soll nach B h a g v a t und D e v i (4) auch in Weizenkeimlingen vorkommen.

In unserem Versuch verwendeten wir Aneurin in den üblichen Konzentrationen, Hydroxypyrimidin und Thiazol in dazu aquimolaren Mengen. Wie aus Tab. 4 hervorgeht, deckten sich die Wirkungen der vereinigten Bestandteile und des ganzen Aneurinmoleküls. Hydroxypyrimidin allein war schwach wirksam, mit Thiazol allein war kein Wachstum von *Ustilago violacea* möglich. Kombinationen der beiden Substanzen mit dem ganzen Vitamin verursachten keine zusätzliche Wirkung.

Tab. 4. Einfluß von 2-methyl-4-amino-5-hydroxy-methyl-pyrimidin (Hydroxypyrimidin) und Thiazol auf das Wachstum von *Ustilago violacea*

(Extinktionswerte in % des Wachstums mit 0,2  $\gamma$  B<sub>1</sub>/Kult., Kulturdauer 16 Tage)

$\gamma$ /Kultur .....	0	0,002	0,02	0,2	2	20
Kontrollen mit B <sub>1</sub> .....	0	33,4	93	100	97,2	91,7
Aquimol. Menge Hydroxypyrimidin	—	8,3	20,8	19,4	26,4	4,2
Thiazol .....	—	2,8	2,8	2,8	1,5	2,8
Hydroxypyrimidin + Thiazol .....	—	44,5	86,1	94,5	90,3	88,8

## b) Aneurin-Analoge

Schopfer (37) prüfte die Wirkung einiger Aneurin-Analoge auf das Wachstum von *Ustilago violacea*; sie erwiesen sich als bedeutend weniger aktiv als das normale Aneurin. Die Substanz mit der Gruppe 2-methyl-3- $\beta$ -hydroxyäthyl-pyridin an Stelle des Thiazols (Heterovitamin) wirkte wenigstens vorübergehend hemmend; besaß diese Verbindung die Hydroxylgruppe statt in  $\beta$ - in  $\alpha$ -Stellung, so war sie in sehr hohen Dosen schwach wachstumsfördernd (38). In keinem Falle wurde aber mit einem der genannten Derivate eine Entwicklung von *Ustilago violacea* beobachtet, die über das mit Aneurin allein erreichbare Optimum hinausging.

Da im Weizenkeimling und im Spinat ein Teil des Aneurins als Cocarboxylase vorliegt (48), war es geboten, noch diese Verbindung auf ihre wachstumsfördernde Wirkung zu untersuchen. Fig. 7 zeigt, daß das Aneurinpyrophosphat nahezu ebenso wirksam war wie das B<sub>1</sub>.

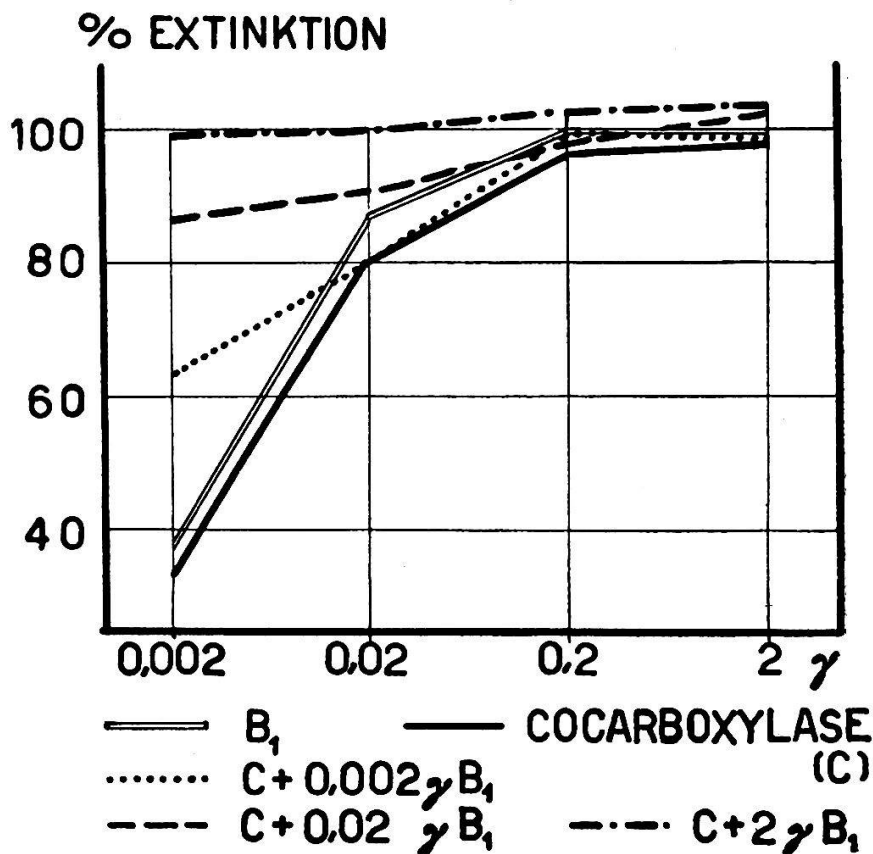


Fig. 7

Wirkung von Cocarboxylase auf das Wachstum von *Ustilago violacea*  
(Kulturdauer 18 Tage)



In Kombinationen addierten sich bei geringen Mengen die Wirkungen dieser beiden Substanzen, bei hohen Dosen entsprachen sie derjenigen, die bei supraoptimaler Konzentration des einen Partners allein eintrat.

*c) Andere Wirkstoffe und Kombinationen verschiedener Substanzen*

Neben dem Aneurin wurden noch andere Vitamine, sowie einige weitere Substanzen, die in geringsten Dosen das Wachstum gewisser Mikroorganismen zu fördern vermögen, in je vier verschiedenen Konzentrationen (allein und in Kombination mit 0,002 und 2  $\gamma$  B<sub>1</sub> / Kult.) geprüft.

<i>Untersuchte Substanzen:</i>	<i>Konzentrationen in <math>\gamma</math> pro Kultur:</i>
Lactoflavin (B <sub>2</sub> )	0,01 — 10
Pyridoxin (B <sub>6</sub> )	0,01 — 10
Nicotinsäureamid	0,1 — 50
Pantothensäure	0,1 — 50
Biotin (H)	0,0001— 0,1
Meso-Inositol	1 —1000
p-Aminobenzoësäure	0,1 — 100
Ascorbinsäure (C)	0,1 — 100
Heteroauxin	0,01 — 10
<b>Pterinderivate:</b>	
Xanthopterin, Leukopterin,	
Isoxanthopterincarbonsäure <sup>1)</sup>	0,02 — 20
Folsäure <sup>2)</sup>	0,0001— 0,1
<b>Nukleinsäuren:</b>	
Hefe- und Thymonukleinsäure	1 —1000
<b>Purinderivate:</b>	
Adenin, Guanin, Xanthin,	
Hypoxanthin, Adenosin,	1 —1000
Adenosinphosphorsäure	

<sup>1)</sup> Durch synthetische Pterinpräparate können Avitaminoseerscheinungen, wie sie bei Fehlen von B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> auftreten bei Ratten und Tauben rückgängig gemacht werden; auch die Gewebeatmung wird durch diese Verbindung intensiviert (28).

<sup>2)</sup> Das Folsäurepräparat entspricht dem Lactobacillus-casei-Faktor, wie er aus Spinatblättern isoliert wurde (24).

<i>Untersuchte Substanzen:</i>	<i>Konzentrationen in <math>\gamma</math> pro Kultur:</i>	
<b>Pyrimidinderivate:</b>		
Cytosin, Uracil, Thymin	1	—1000
<b>Aminosäuren:</b>		
$\beta$ -Alanin	1	— 500
Aminosäuremischung «Roche» <sup>3)</sup>	1	—1000

Um die Versuche nicht allzusehr auszudehnen, wurden Kombinationen mit optimaler B<sub>1</sub>-Dosis (0,2  $\gamma$ /Kult.) weggelassen. Unter den gewählten Bedingungen hätte gleichwohl eine allfällig zu Aneurin zusätzliche Wirkung der Substanzen auf das Wachstum von *Ustilago violacea* deutlich zum Ausdruck kommen müssen.

Das Pilzwachstum wurde nach 14—18 Tagen Kulturdauer durch Trockengewichtsbestimmung gemessen.

Die verwendeten Substanzen sind wohl zu einem großen Teil auch in den Extrakten aus Weizenkeimlingen und Spinatblättern enthalten. Aber weder allein, noch in Gegenwart von B<sub>1</sub> übten sie eine über  $\pm 10\%$  hinausgehende Wirkung auf das Wachstum von *Ustilago violacea* aus (verglichen mit den entsprechenden Aneurinkontrollen). Die von Schöpfer und Blumer beobachtete geringe Entwicklungssteigerung mit Heteroauxin und hohen Dosen Pantothersäure (40) konnte nicht reproduziert werden. Vielleicht war das damals zur Verfügung stehende Pantothersäure-Präparat nicht ganz rein.

Die vorliegenden Befunde zeigen, daß die über die Wirkung von Aneurin hinausgehende Aktivität der Extrakte nicht auf möglicherweise in ihnen enthaltene, oben genannte Verbindungen zurückgeführt werden kann. Besonders geeignete Kombinationen der erwähnten Substanzen könnten allerdings synergistisch wirken, so daß gleichwohl eine Entwicklungssteigerung des Pilzes zustande käme.

Wir prüften deshalb noch folgende willkürlich gewählte Kombinationen:

1. Aminosäuremischung + Berthelot-Mischung + Aneurin
2. Biotin + Meso-Inositol + Aneurin,

<sup>3)</sup> Aminosäuremischung „Roche“: Natürliche Mischung von Aminosäuren, erhalten aus der vollständigen Hydrolyse eines Proteins.

3. Pantothensäure + Mesoinositol + Aneurin,
4. Pantothensäure +  $\beta$ -Alanin + Pyridoxin + Biotin + Mesoinositol + Aneurin + Spurenelemente (B, Zn, Mn, Ti, Fe, Cu, K).

Konzentrationen der Bestandteile: Aminosäurenmischung 10 und 1000  $\gamma$ , Berthelot 0,05 cmm, Biotin 0,001 und 0,1  $\gamma$ , Meso-Inositol 10 und 1000  $\gamma$ , Pantothensäure 1 und 50  $\gamma$ , pro Kultur; Kombination 4 in denselben Mengenverhältnissen wie von Williams und Mitarb. (53) für *Sacharomyces cerevisiae* angegeben; die B<sub>1</sub>-Menge wurde in jedem Versuch variiert von 0—2  $\gamma$ /Kultur.

Nach 15 Tagen Kulturdauer war das Trockengewicht von *Ustilago violacea* nur bei Kombination 1. um 15 % höher (bei supraoptimaler B<sub>1</sub>-Dosis), als der Wert mit optimaler Aneurinkonzentration. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen der Spurenelementversuche; die Wirkung wurde also nicht durch die Aminosäuren verursacht.

Die übrigen Kombinationen waren unwirksam. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß mit andern Substanzzusammenstellungen dennoch eine fördernde Wirkung auf das Wachstum von *Ustilago violacea* erzielt werden könnte.

---

Aus Kap. 4 und 5 ergibt sich, daß auf *Ustilago violacea* außer dem Hauptwachstumsfaktor Aneurin (d. h. den beiden Komponenten Pyrimidin und Thiazol) nach andere Substanzen zusätzlich wirksam sind. Zum Teil sind diese in Weizenkeim- und Spinatextrakt enthaltenen Stoffe mineralischer Natur (Aschen), doch kann mit ihnen die volle Extraktwirkung nicht erreicht werden. Eine große Zahl von organischen Verbindungen, die als Wachstumsfaktoren für Mikroorganismen in Frage kommen, vermochte das Wachstum des Pilzes ebenfalls nicht zu steigern. Es ist deshalb anzunehmen, daß entweder noch unbekannte Substanzen oder besonders günstige Kombinationen von Faktoren in den Extrakten sich auswirken.

## 6. Behandlung der wirksamen Extrakte

### a) Hitze-, Säure- und Laugebehandlung

In diesem Versuch wurden folgende Extrakte allein und in Kombination mit suboptimalen und supraoptimalen B<sub>1</sub>-Mengen der Nährlösung zugesetzt:

		Pro Kultur :
	1. WKE 11 (Weizenkeimextrakt, s. S. 63), Spinatextrakt (frisch bereitet);	0,1 ccm
	2. je 50 ccm während 8 Std. im Autoklaven auf 115 ° erhitzt;	0,1 ccm
	3. je 20 ccm mit je 10 ccm $\frac{n}{20}$ HCl oder NaOH während 15 Minuten bei 015 ° behandelt, nachher mit der äquivalenten Menge Lauge, resp. Säure, neutralisiert, so daß total je 40 ccm Extrakt.	0,2 ccm

Um überall gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden sowohl den Aneurin-Kontrollen wie bei den Extrakten 1. und 2. pro Kultur 0,1 ccm der HCl-NaOH-Lösung zugesetzt.

Aus Fig. 8 geht hervor, daß Hitzebehandlung der Extrakte die Wirkung derselben auf *Ustilago violacea* nicht verminderte, was verständlich ist, da bei hoher Temperatur Aneurin in Pyrimidin und Thiazol gespalten wird (41), die zusammen ebenso wirksam sind, wie das ganze Molekül. Gegen Säure war der WKE 11 unempfindlich; Lauge zerstörte nur dessen B<sub>1</sub>, was daraus hervorgeht, daß bei Zugabe von synthetischem Aneurin die ursprüngliche Extraktwirkung nahezu wiederhergestellt wurde. Beim Spinatdekot konnte nach Säure- und Laugebehandlung auch mit B<sub>1</sub> das Pilzwachstum nicht mehr über das mit diesem Vitamin allein erreichbare Optimum hinaus gesteigert werden. Die Wirksamkeit des Aneurinanteils schien hier in beiden Fällen stark herabgesetzt, die zusätzlich wirkenden Extraktstoffe waren überhaupt inaktiviert.

Stellt man diese Ergebnisse einander gegenüber, so fällt einem eine gewisse Parallelität der Reaktionen von Extrakt-B<sub>1</sub> und den komplementär wirkenden Extraktsubstanzen auf. Diese Verhältnisse geben zu der Vermutung Anlaß, daß einerseits «Aneurinanteil» und «Komplementäranteil» der Extrakte in engen Beziehungen zueinander stehen oder sogar bloß verschiedenen Teilen eines geschlossenen Komplexes entsprechen (vielleicht dem Fermentsystem, an dem das B<sub>1</sub> beteiligt

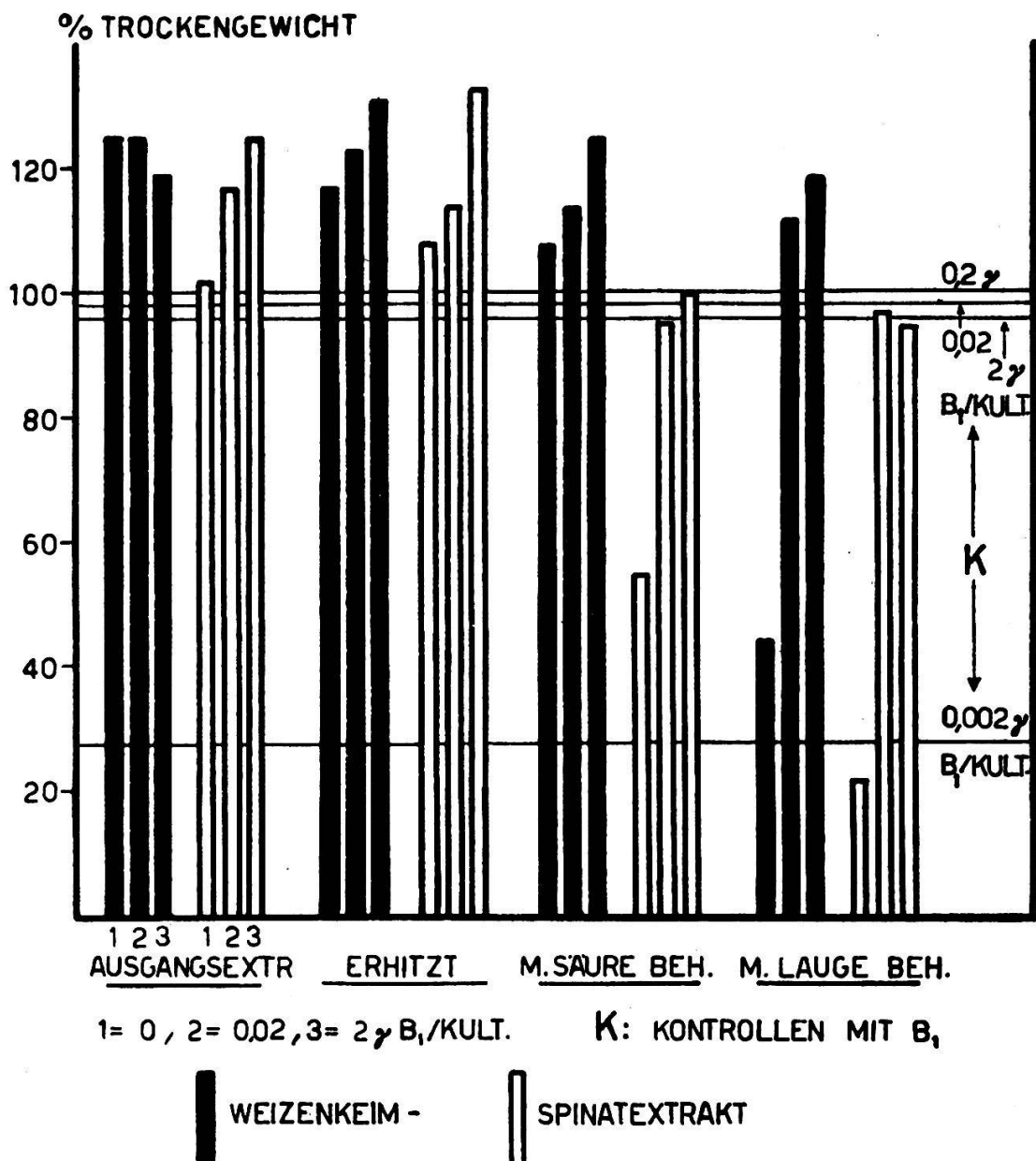


Fig. 8

Wirkung von Weizenkeim- und Spinatextrakten, die einer Hitze-, Säure- oder Laugebehandlung unterworfen waren, auf *Ustilago violacea* (Kulturdauer 11 Tage)

ist), andererseits im WKE 11 und im Spinatabsud ungleich gebundene, auf *Ustilago violacea* aber gleich wirkende Bestandteile vorliegen.

Sure (46) beschrieb eine Erscheinung, die ähnlich sein könnte: unter bestimmten Bedingungen wurden durch Phosphatasepräparate bei Hefen kein Aneurin freigesetzt, wohl aber bei Weizenkeimlingen,

was darauf beruhe, daß die Cocarboxylase in den beiden Produkten nicht in gleichen Kombinationen vorkomme.

Der Weizenkeimextrakt war möglicherweise darum weniger laugeempfindlich, weil er einer längern Wärmebehandlung ausgesetzt gewesen war als der Spinatauszug. Das würde gut einer Beobachtung von Müller (26) entsprechen, der fand, daß in Reiskleie- und *Pisum*-extrakten die auf *Phycomyces Blakesleeanus* wirksamen Faktoren alkaliresistent waren, da sie durch Hitzebehandlung in die laugeunempfindlichen Bestandteile Pyrimidin und Thiazol zerlegt worden waren.

#### b) Bleiazetat- und Phosphorwolframsäurefällung, Kohleadsorption im Weizenkeimextrakt

Wildiers erkannte 1901 (52), daß für die Entwicklung der Hefe eine Substanz in sehr geringen Mengen unentbehrlich ist, die er «Bios» nannte. Später stellte es sich heraus, daß es sich hierbei um einen Komplex von Faktoren handelt, die zum Teil rein dargestellt werden konnten (Aneurin, Meso-Inositol, Biotin,  $\beta$ -Alanin u. a.). Zur Reinigung und Auftrennung des Komplexes wurden verschiedene Verfahren vorgeschlagen, hauptsächlich Bleiazetat-, Phosphorwolframsäure- und Tierkohlebehandlungen.

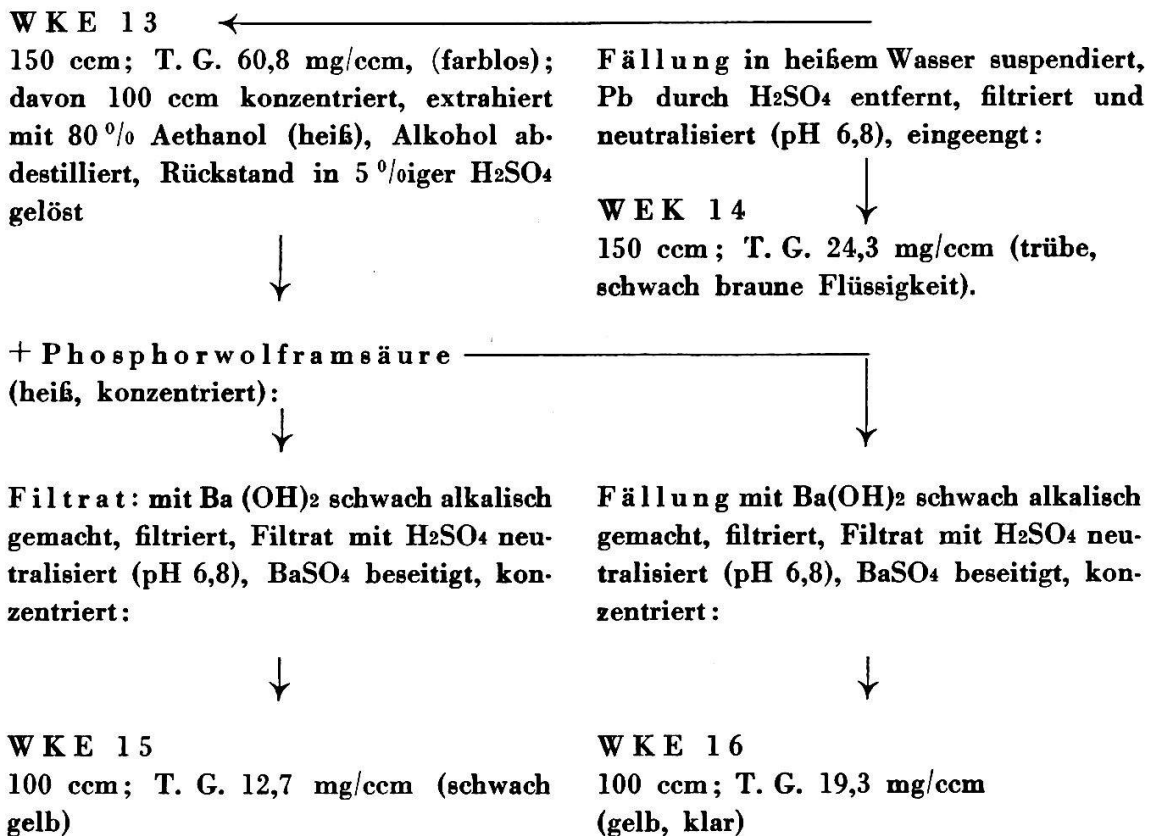
Um festzustellen, ob die für das Wachstum von *Ustilago violacea* zu B<sub>1</sub> zusätzlich wirksamen Extraktstoffe in Beziehung stehen zur «Bios»-Gruppe, versuchten wir die Auftrennung des Weizenkeimextraktes durchzuführen nach einer Methode, wie sie von Wassink (51) und Schöpfer (33) in Anlehnung an ältere Arbeiten (11, 17, 20, 23, 27) angegeben wurde:

Der Extrakt wurde nach dem folgenden Schema verarbeitet:

WKE 11 (s. S. 63) —————> + Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung (heiß, konzentriert); Fällungen (haupts. Eiweißbestandteile und Kohlehydrate) verworfen; Ba aus dem Filtrat mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entfernt; entst. Filtrat konz. (pH 6,8):

200 ccm; T. G. 123,9 mg/ccm, (dunkelbrauner, sirupöser Extrakt, 1 ccm entspr. 1 g trock. Weizenkeimlinge)

WKE 12 ←—————  
200 ccm; T. G. 85,2 mg/ccm, (goldgelbe klare Flüssigkeit): 150 ccm davon —————> + neutrales Bleiazetat, über Nacht stehen gelassen;  
Filtrat mit H<sub>2</sub>S bleifrei gemacht konz. (pH 6,8):



Die so hergestellten Extrakte wurden in einem Versuch mit *Ustilago violacea* geprüft; die Ergebnisse sind in Fig. 9 zusammengestellt.

Völlig unwirksam waren WKE 14 und WKE 15. Der erste soll nach Wassink (51) den Hauptanteil an B<sub>2</sub> enthalten, das ja auch in den Versuchen mit synthetischen Substanzen ohne jeden Einfluß blieb. Da mit diesen beiden Fraktionen keine wichtigen Stoffe weggingen, ist es nicht erstaunlich, daß der WKE 16 das Wachstum von *Ustilago violacea* noch fast ebenso stark fördern konnte wie die Ausgangsextrakte, ob- schon sein Trockengehalt mehr als 6mal kleiner war als derjenige des WKE 11. Die Extrakte wirken also sicher nicht bloß als Nährstoffe. Das gesuchte aktive Prinzip kann sodann nicht einfach identisch sein mit einer der bekannten «Bios»-Komponenten (nach Wassink [51]: Meso-Inositol, Biotin, β-Alanin, Pantothersäure, Adermin), da diese sich einzeln und in Kombinationen als unwirksam erwiesen (s. Kap. 5). WKE 11 und WKE 13 zeigten auch eine bedeutend höhere Aktivität als ihre mineralischen Bestandteile (s. Kap. 4 a). Die Hauptwirkung dürfte deshalb durch organische Stoffe (möglicherweise in besonders günstigen Kombinationen) verursacht werden.

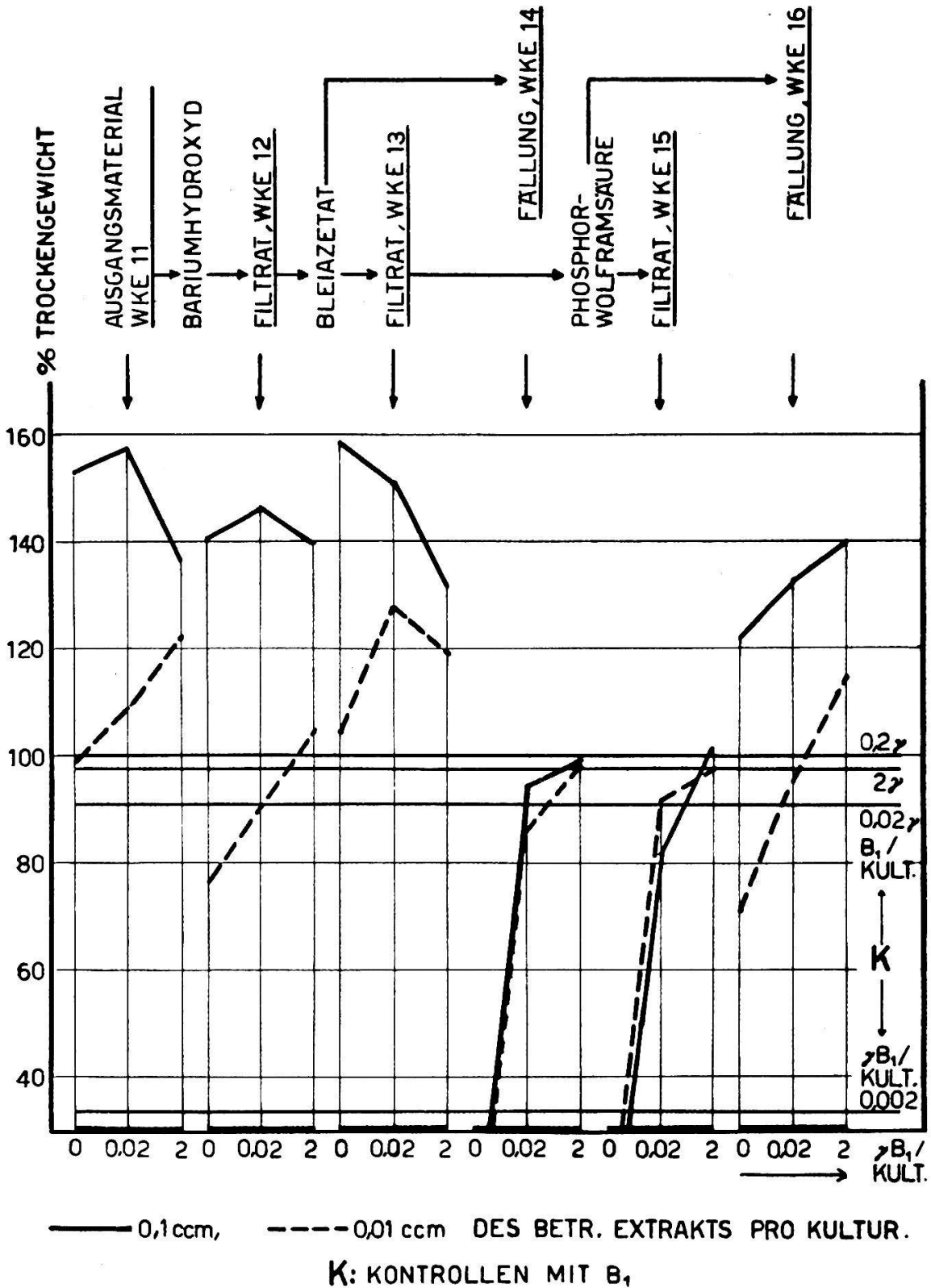


Fig. 9

Wirkung der „Bios“-Fraktionen des Weizenkeimextraktes auf das Wachstum von *Ustilago violacea* (Kulturdauer 18 Tage)



Durch Behandlung mit Tierkohle versuchten wir eine weitere Aufteilung des WKE 16 zu erreichen:

20 ccm dieses Extrakts wurden mit 1 g Tierkohle („Merk“) während 2 Std. leicht erwärmt, nachher filtriert:

**Filtrat**

so verdünnt, daß 1 ccm 1 g trockenem Weizenkeim entspricht;  
Trockengehalt: 8,3 mg/ccm.

**Kohle-Eluat:**

Kohle 2 mal mit 80 %igem, angesäuerten Aethanol ausgezogen, Eluate zur Trockne eingedampft, mit 20 ccm Wasser aufgenommen, 1 ccm entspricht 1 g trockenem Weizenkeim; Trockengehalt 3,7 mg/ccm.

Aus Tab. 5 ist ersichtlich, daß eine gewisse Trennung aktiver Stoffe erzielt werden konnte: das Kohlefiltrat allein war von nur geringer Wirkung auf *Ustilago violacea*; bei Zugabe von B<sub>1</sub> konnte ungefähr die Wirkung des WKE 16 wiederhergestellt werden. Daraus darf man schließen, daß wenigstens ein Teil des zu Aneurin zusätzlich wirksamen Prinzips von Tierkohle nicht absorbiert wird. Der andere Teil gelangt mit einer offenbar beträchtlichen B<sub>1</sub>-Menge ins Eluat.

Tab. 5. Wirkung von Kohlefiltraten und -Eluaten des WKE 16 auf das Wachstum von *Ustilago violacea*

(Pilzgewicht mit optimaler B<sub>1</sub>-Dosis = 100 %; Kulturdauer 14 Tage)

$\gamma$ B <sub>1</sub> /Kultur .....	0	0,02	0,2	2
Kontrollen mit B <sub>1</sub> .....	7,3	91,1	100	99,2
WKE 16 (0,1 ccm) .....	123,4	128,2	—	133,8
Kohle-Filtrat (0,1 ccm) .....	55,7	104,8	—	114,2
Kohle-Eluat (0,1 ccm) .....	111,3	108,8	—	126,6
Filtrat + Eluat (je 0,1 ccm) .....	131,5	129	—	128,3

Schopfer und Moser (25, 32, 33) fanden bei ihren Arbeiten über den Einfluß des Weizenkeimextraktes auf verschiedene Pilze, daß ein auf *Rhizopus* wirksamer Faktor MR, der von Tierkohle nicht adsorbiert wurde, dem Meso-Inositol entspreche. Ein MP-Faktor, nur zum Teil durch Phosphorwolframsäure fällbar war aktiv für *Phycomyces Blakesleanus* u. a., woraus Müller (26) schloß, daß dieser zum Teil den Komponenten Pyrimidin und Thiazol gleichzusetzen sei.

Von diesen Substanzen war aber keine imstande, das Wachstum von *Ustilago violacea* stärker zu fördern als das B<sub>1</sub>. Auf Grund der vor-

liegenden Beobachtungen vermuten wir, daß im Weizenkeimextrakt ein eng mit dem Aneurin-Komplex verknüpftes, noch nicht isoliertes, aktives Prinzip die gegenüber  $B_1$ -Kontrollen auffällige Entwicklungssteigerung unseres Pilzes verursacht.

### c) Dialyse des Weizenkeimextraktes

Aus einem Gemisch treten je nach Molekülgröße und -Beschaffenheit die Bestandteile verschieden rasch durch eine semipermeable Membran hindurch. Zur Verfeinerung des so erreichbaren Trennvermögens entwickelten Signer und seine Mitarbeiter am organisch-chemischen Institut der Universität Bern eine Apparatur, die mit mehreren hintereinandergeschalteten Dialysezellen nach folgendem Prinzip arbeitet (42, 47):

In entgegengesetzter Strömungsrichtung streichen an den beiden Seiten der Membran aufzutrennendes Gemisch und Lösungsmittel vorbei. Dieses nimmt die sehr rasch durchtretenden Substanzen auf und gibt davon die am schnellsten dialysierenden (nach Passieren eines Konzentrators, in dem Lösungsmittel abgedampft wird) in einer nächsten Zelle an neues Lösungsmittel weiter. Die erste Lösung, nun wieder dem ursprünglichen Gemisch gleichend, wird der Gemischseite der vorhergehenden Dialysezelle erneut zugeführt. Auf diese Weise wird das am leichtesten permeierende Material in der Vorlage angereichert: das Verhältnis der Komponenten eines Gemisches ist in der Dialysatlösung zugunsten der am raschesten durchlaufenden verschoben. Selbst Stoffe, die sich nur wenig voneinander unterscheiden, können so getrennt werden.

Der zur Dialyse gelangende Weizenkeimextrakt (WKE 23) wurde frisch hergestellt nach dem gleichen Verfahren wie der WKE 13. Damit war bereits eine beträchtliche Reinigung erzielt, ohne daß die Wirksamkeit auf *Ustilago violacea* eingebüßt worden wäre. Die klare, goldgelbe Lösung enthielt in 1250 ccm 45,88 g Substanz und entsprach 400 g getrocknetem und entfettetem Weizenkeimmehl.

Nach Zusatz von Ammoniumcarbonat zur Vermeidung von Infektionen durch Mikroorganismen in der Apparatur (ein Vorversuch mit unserem Pilz ergab, daß dadurch der Extrakt keine Wirkungseinbuße erlitt) gelangte der WKE 23 zur Dialyse ins organ.-chem. Institut, wo er während 20 Tagen eine Kolonne mit fünf Zellen passierte.

Die Strömungsgeschwindigkeiten waren beidseits der Membran gleich, wurden aber jeweils nach vier Tagen etwas herabgesetzt. Vom zweiten Tage an wurde täglich die Dialysatvorlage geleert. Die so anfallenden 19 Fraktionen dampften wir im Vakuum ein zur Entfernung des Ammoniumcarbonates. Der Trockengehalt betrug im Mittel 713 mg pro Fraktion; die teilweise erheblichen Unterschiede entsprachen keinen gesetzmäßig erfaßbaren Beziehungen. Der nichtdialysierte Restextrakt enthielt noch 26,841 g Substanz; der Substanzverlust in der Kolonne belief sich auf 8,4 % des eingebrachten Materials.

Vom zurückbehaltenen Ausgangsextrakt (WKE 23), von den Dialysaten und vom nichtdialysierten Restgemisch (R) stellten wir Lösungen mit einheitlichem Trockengehalt von 10 mg/ccm (entspr. ungefähr 87 mg trockenem Weizenkeimmehl) her, die folgende Eigenschaften zeigten:

	Farbe	pH	Fehling	Ninhydrin
WKE 23 (Ausgangsmaterial, A)	goldgelb	6,3	++++	++++
Dialysate 1—10	farblos - goldgelb	7,8—8,3	0	0
„ 11—14	übergehend nach	6,5—7,3	0	+
„ 15—19	dunkel rotbraun	5,8—6,7	0	++
Nichtdialysierender Rest (R)	trüb-dunkelbraun	5,2	+++	+++

Die Bedingungen und Ergebnisse der Versuche mit *Ustilago violacea* durchgeführt mit einer Auswahl dieser Präparate sind in Fig. 10 dargestellt (Konzentrationen der Präp.: 0,1 und 1 ccm / Kultur; Kombinationen mit 0, 0,02 und 2  $\gamma$  B<sub>1</sub> / Kult.).

Aus verschiedenen Gründen vergingen zwischen Extrakterstellung und Beginn des Versuches mit dem Pilz fast drei Monate. In dieser Zeit hatte die Wirksamkeit der Extrakte dermaßen abgenommen, daß das Wachstum des Pilzes kaum mehr über das mit Aneurin erreichbare Optimum hinaus gefördert werden konnte. Die Ursache dieser Wirkungseinbuße ist nicht erklärlich; sie kann nicht dem Ammoniumcarbonat zugeschrieben werden, da die zurückbehaltene, unbehandelte und anfänglich sehr stark aktive Portion des WKE 23 dieselbe Erscheinung zeigte, während der unter gleichen Bedingungen — sterilisiert, im Kühlschrank — aufbewahrte WKE 13 während einem Jahr unverändert blieb.

Eine deutliche Anreicherung der zusätzlich zu B<sub>1</sub> wirksamen Stoffe in einem der Dialysate war deshalb wenigstens bei 16 Tagen Kulturdauer nicht feststellbar. Dagegen erschien die größenordnungsmäßig der Wirkung von reinem Aneurin entsprechende noch vorhandene Aktivität des WKE 23 aufgeteilt: Dialysat 1 hatte die höchste Wirksamkeit, dann fiel sie ziemlich gleichmäßig ab bis zu Dialysat 18, um dann fast sprunghaft wieder zuzunehmen (Dialysat 19 und nicht

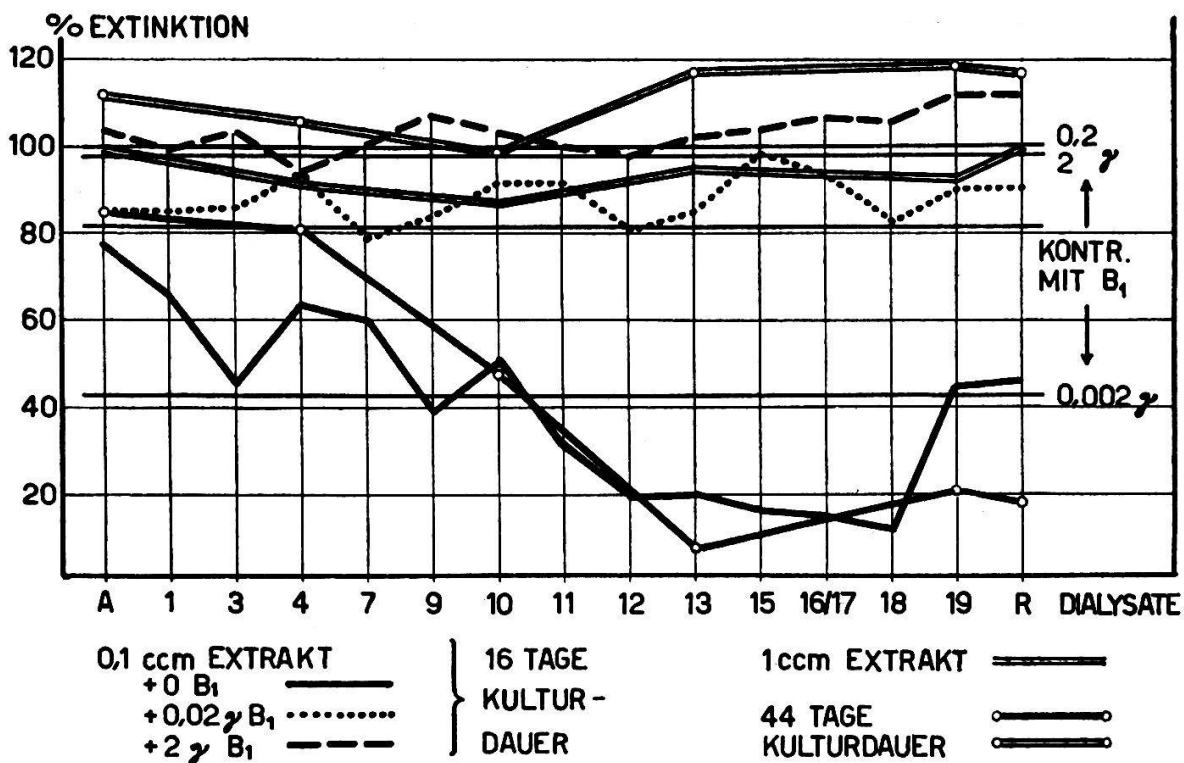


Fig. 10

Wirkung von Weizenkeimextrakt-Dialysaten auf das Wachstum von *Ustilago violacea*

dialysierte Restlösung R). Diese Unterschiede waren aber nur bei geringer Präparatdosis deutlich; mit der hohen Konzentration verlief die Wachstumskurve etwas unterhalb derjenigen mit optimaler Aneurinmenge. Wurden die Präparate in Kombinationen mit B<sub>1</sub> angewendet, so lagen die Wachstumswerte ungefähr gleich hoch wie die der betreffenden Aneurinkontrollen.

Mit dem Ausgangsextrakt (WKE 23), den Dialysaten 4, 10, 13, 19 und der Restlösung R wurde die Kulturdauer noch auf 44 Tage ausgedehnt (die Werte der Kombinationen mit Aneurin sind weggelassen, da sie ziemlich genau denjenigen, die bei kurzer Entwicklungszeit erhalten wurden, entsprachen).

Hier kam bei starker Präparatdosis ein Rest der über die Wirkung von bloßem Aneurin hinausgehenden Aktivität des WKE 23 doch noch zum Ausdruck. Sie war nicht sehr stark im Ausgangsextrakt, kam aber von Dialysat 13 an deutlich zur Geltung. Bei geringer Präparatmenge verlief die Kurve ähnlich wie für die bloß 16 Tage alten Kulturen.

Die vorliegenden Resultate lassen zwar keine endgültigen Folgerungen zu, doch können daraus einige Hypothesen abgeleitet werden:

1. Betrachtet man die Kurven mit schwacher Dialysatkonzentration (0,1 ccm / Kultur), so scheint es, daß mit den ersten Dialysaten hauptsächlich die niedrig molekularen Bestandteile der B<sub>1</sub>-Gruppe, z. B. Pyrimidin und Thiazol weggehen, Cocarboxylase und Substanzen mit größeren Molekülen aber erst zuletzt oder überhaupt nicht, so daß deshalb die Wirkung der Dialysate auf *Ustilago violacea* absank bis zu Dialysat 18, um dann plötzlich wieder zuzunehmen.

2. Man könnte aber auch an das Vorhandensein von Hemmstoffen denken, die mindestens die Wirkung der B<sub>1</sub>-ähnlichen Dialysatbestandteile fast ganz aufzuheben vermögen. Der ziemlich gleichmäßige Abfall der Dialysatwirkung von 1—18 wäre also auf eine zunehmende Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen fördernden und hemmenden Substanzen zugunsten der letzten zurückzuführen. Bei hoher Dosierung der Präparate (1 ccm / Kultur) hätten dann die fördernden Faktoren gegenüber den hemmenden ein Uebergewicht, da die Wirkungen dieser Antagonisten einander nicht einfach parallel wären.

3. Die mit Dialysat 19 und der Restlösung wieder auftretende Wachstumsförderung könnte auch durch einen unbekanntem, langsam dialysierenden Faktor verursacht worden sein. Die bloß geringe Anreicherung dieser Substanz in den Präparaten 19 und R gegenüber den ersten Dialysaten wäre vielleicht der Grund dafür, daß nur bei hoher Präparatdosis (1 ccm / Kultur) und erst bei längerer Kulturdauer (44 Tage) ihre über reines B<sub>1</sub> hinausgehende Wirkung auf *Ustilago violacea* zum Ausdruck käme.

4. Die pH-Werte der Dialysate dürften ohne Einfluß geblieben sein. Dagegen bestand gute Uebereinstimmung in der Verteilung von Aminosäuren (Ninhydrin-Reaktion) und der bei Dialysat 19 und der Restlösung auftretenden Aktivität. Daraus wäre zu schließen, daß die wachstumsfördernden Substanzen als Cofermente mit eiweißartigen Trägern verbunden sind, oder daß ein Teil von ihnen Protein-Charakter hat.

#### *d) Aether- und Chloroformauszüge des Spinatextraktes*

Da der Spinatabsud auf Alkali und Säure empfindlicher war als der Weizenkeimextrakt (s. Fig. 8), sahen wir von einer Behandlung mit Bariumhydroxyd, Bleiazetat und Phosphorwolframsäure ab.

Von einem Dekokt aus trockenem Spinatblattpulver (50 g mit 500 cmm Wasser im Autoklaven während 15 Minuten bei 115 ° extrahiert,

filtriert und auf 50 ccm konzentriert) wurden Portionen von 5 ccm mit Aether und Chloroform ausgeschüttelt, die verschiedenen Phasen abgetrennt und im Vakuum eingedampft. Die wässerigen Lösungen der Trockenrückstände zeigten auf *Ustilago violacea* die in Tab. 6 angegebenen Wirkungen.

Tab. 6. Wirkung der aether- und chloroformlöslichen Bestandteile eines Spinatextraktes auf *Ustilago violacea*

(Extinktion mit optimaler B<sub>1</sub>-Dosis = 100 0/0; Kulturdauer: 15 Tage)

$\gamma$ B <sub>1</sub> /Kultur .....	0	0,02	0,2	2
Kontrollen mit B <sub>1</sub> .....	14,9	92,5	100	97
Ausgangsextrakt .....	114,9	131,4	129,8	123,8
Aether-Fraktion .....	19,4	95,5	86,6	89,6
Nicht ätherlöslicher Rest .....	103	123,8	116,4	123,8
Chloroform-Fraktion .....	50,7	88,1	97	111,9
Nicht chloroformlöslicher Rest 0,1 ccm/Kult.	97	113,5	135,8	158,8

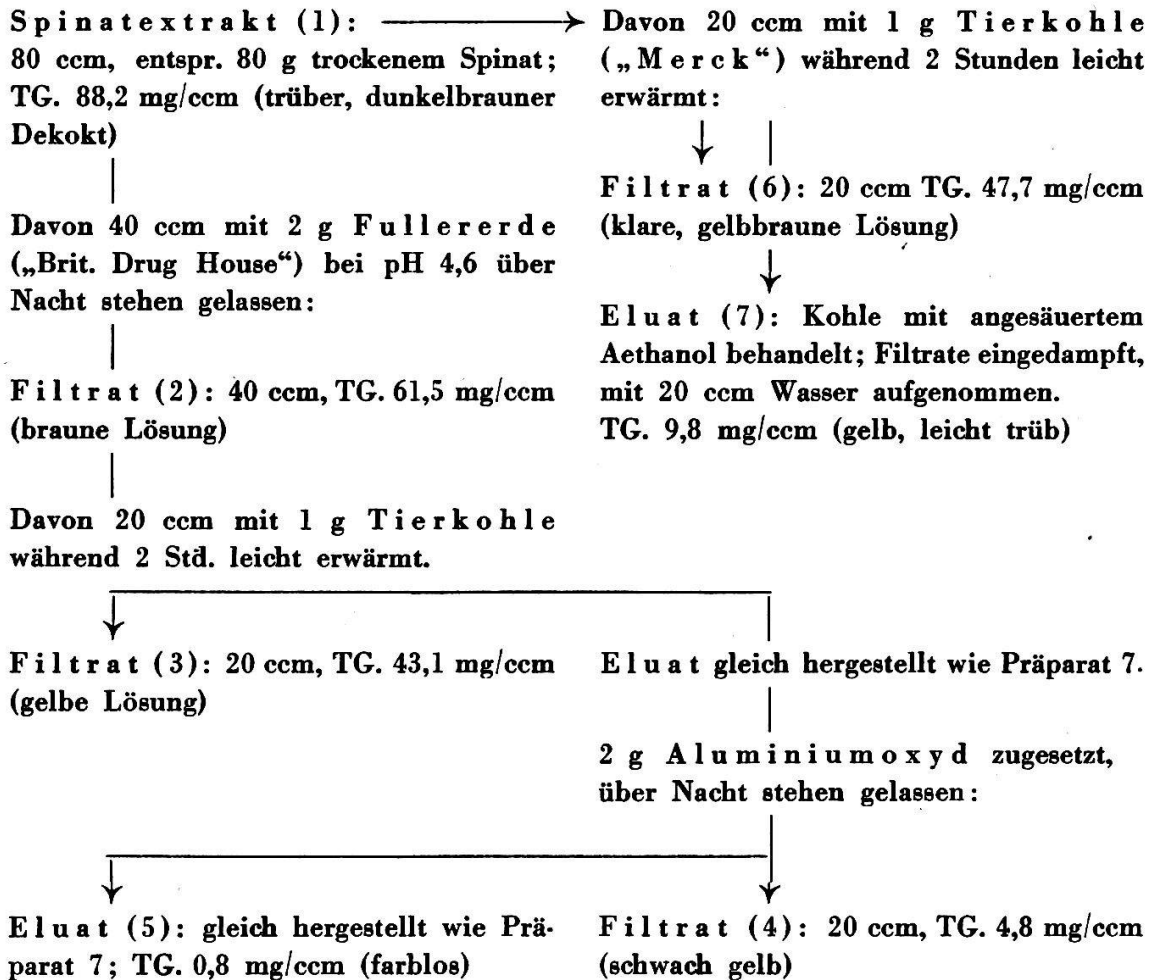
Die ätherlöslichen Substanzen des Spinatextraktes waren unwirksam. Dagegen zeigten chloroformlösliche Stoffe, sowohl allein, wie in Gegenwart einer supraoptimalen Aneurindosis eine schwach fördernde Wirkung auf das Wachstum von *Ustilago violacea*. Auch Schopfer (34) hatte eine ähnliche Aktivität chloroformlöslicher Bestandteile aus Weizenkeimlingen und Harn festgestellt.

Das Vorhandensein eines unbekanntem Faktors ist hier ebenfalls nicht ausgeschlossen. Andererseits könnten trotz sorgfältiger Entwässerung des Chloroforms jeweiligen kleinste Mengen Aneurin in Wassertropfen mitgeschleppt worden sein. Damit ließe sich aber die über die Wirkung von reinem B<sub>1</sub> hinausgehende Förderung des Pilzwachstums nicht erklären.

Die weder äther- noch chloroformlöslichen Phasen wiesen die ursprünglichen Eigenschaften des Extraktes noch nahezu unvermindert auf. Eine einigermaßen deutliche Auftrennung des Extraktes in Bestandteile, die wie B<sub>1</sub> wirken, und in solche, die das Wachstum des Pilzes noch darüber hinaus zu fördern vermögen, erfolgte nicht.

e) Kohle-, Fullererde- und Aluminiumoxydadsorptionen im Spinatextrakt

Nach einigen Vorversuchen wurden mit 80 ccm eines Spinatabsudes, hergestellt wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, folgende Präparate bereitet:



Alle Lösungen waren so eingestellt, daß 1 ccm Flüssigkeit 1 g Trockenblattpulver entsprach.

Diese wurden nach der in Fig. 11 angegebenen Weise zu einem Versuch mit *Ustilago violacea* verwendet.

In der starken Konzentration (1 ccm / Kultur) war das Fullererdefiltrat (2) ebenso wirksam wie der Ausgangsextrakt; nur bei kleiner Dosierung (0,1 ccm / Kultur) erschien die Aktivität deutlich vermindert. Möglicherweise wurde nicht alles Aneurin aus dem Extrakt adsorbiert (bei pH 4,6 wird sowieso die Thiazolkomponente von Fullererde nicht zurückgehalten).

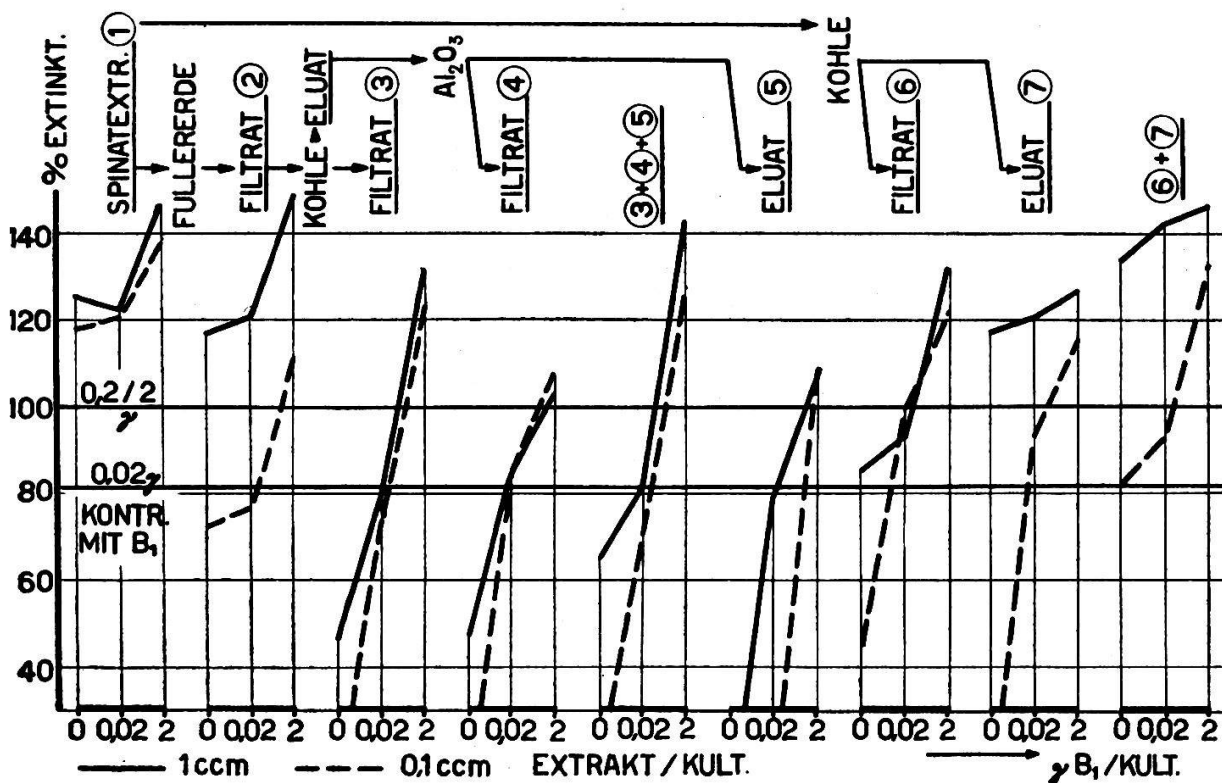


Fig. 11

Wirkung verschiedener Spinatextrakt-Präparate auf das Wachstum von *Ustilago violacea* (Kulturdauer 16 Tage)

Die Reinigung mit Tierkohle führte zu keiner eindeutigen Trennung aktiver Stoffe (Präp.: 6 und 7). Die Wirkungen der Präparate glichen auffällig denjenigen der kohlebehandelten WKE 16-Lösungen (obschon das Verhältnis der Trockensubstanzen — Eluat / Filtrat — in den beiden Fällen sehr verschieden war). Die wirksamen Substanzen des Weizenkeim- und des Spinatextraktes könnten demnach gleicher Art sein.

Wurde die Kohleadsorption erst nach Fullererdebehandlung durchgeführt, so fanden sich im Filtrat (3) hauptsächlich die Stoffe, die das Wachstum von *Ustilago violacea* über das mit Aneurin allein erreichbare Optimum hinaus zu steigern vermochten («Komplementäranteil»). Allein blieben sie unwirksam; ihre Aktivität kam erst bei Zugabe einer supraoptimalen Aneurindosis sehr deutlich zum Ausdruck. Präparat 3 hatte verglichen mit dem Ausgangsextrakt nur noch die Hälfte an Trockensubstanz, so daß auch hier von einer bloß plastischen oder energetischen Wirkung der Extrakte nicht die Rede sein kann.



Die Chromatographie der Extrakte an Aluminiumoxyd führte zu keinen einwandfreien Ergebnissen. Wir benutzten deshalb dieses Mittel lediglich zur Entfernung trübender Farbstoffe aus einem Kohleeluat. Die betreffenden Präparate 4 und 5 zeigten allein keine nennenswerte Wirksamkeit und konnten — als Zusatz — auch diejenige des Präparates 3 nicht wesentlich steigern. Der größte Teil der Trockensubstanz blieb mit den Farbstoffen im Adsorbens zurück.

Es gelang also in einem Fall (Kohlefiltrat des Fullererdefiltrates) die zu B<sub>1</sub> zusätzlich wirksamen Stoffe des Spinatextraktes teilweise abzutrennen, was nicht ausschließt, daß sie in engen Beziehungen zum Aneurin-Komplex stehen.

## 7. Zusammenfassung

a) *Ustilago violacea* (Pers.) Fuck., gedeiht gut auf einer synthetische Nährlösung enthaltenden Glukose, Asparagin, sekundäres Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat, wenn ihr B<sub>1</sub> oder dessen Komponenten Pyrimidin und Thiazol beigelegt werden. In unsern Versuchen war die optimale B<sub>1</sub>-Dosis etwas höher als Schöpfer und Blumer (40) angeben.

Die optimale Wasserstoffionenkonzentration des Milieus liegt bei pH 4,6; eine deutliche Entwicklungshemmung des Pilzes tritt erst in alkalischem Bereich ein. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Blumer (5) überein.

Pektin kann bei Abwesenheit von Aneurin durch seine vitaminischen Verunreinigungen ein Wachstum des Pilzes ermöglichen. Es stellt aber nicht eine spezifische Kohlenstoffquelle dar, auf der *Ustilago violacea* das B<sub>1</sub> selbst synthetisieren kann. Die Folgerungen von Gerhardt (12) sind somit nicht bestätigt.

b) Durch geringe Mengen von natürlichen Extrakten (aus Weizenkeimlingen, Spinat, Melandrium-Blättern und Leber) in der synthetischen Nährlösung kann die Entwicklung von *Ustilago violacea* erheblich über das mit B<sub>1</sub> allein erreichbare Optimum hinaus gesteigert werden. Es kann sich dabei nicht um eine Nährstoffwirkung handeln. Ebensowenig beruht diese Wachstumsförderung auf einer bloßen Erhöhung der Aneurinmenge durch die Extrakte.

c) Mit Dekokten von *Ustilago violacea* (Eigenextrakten) wird ein stärkeres Wachstum dieses Pilzes hervorgerufen, wenn die extrahierten Pilzzellen auf einem Milieu mit Weizenkeim- oder Spinatextrakt statt bloß auf rein synthetischer Nährlösung wuchsen. Die Entwicklung geht aber nicht über die mit optimaler  $B_1$ -Dosis erreichbare hinaus. Ein zusätzlich zu Aneurin wirksamer Faktor ist demnach in den auf extrakt-haltiger Lösung gewachsenen Zellen nicht vorhanden, wohl aber mehr  $B_1$  als in den Zellen, die sich in reinem Milieu entwickeln.

d) Mit Aschensubstanzen von Weizenkeim- und Spinatextrakten in Gegenwart einer supraoptimalen Aneurinmenge (die optimal wirksame Dosis dieses Vitamins ist auch in Gegenwart der Extrakte leicht erhöht) kann ein Mehrwachstum von *Ustilago violacea* gegenüber reinen Aneurinkontrollen erzielt werden, aber lange nicht so stark wie mit den Extrakten. Eine geringe zusätzliche Wirkung übt auch die Spurenelementmischung nach B e r t h e l o t (1) aus. Von ihren Komponenten ist vor allem Cu aktiv.

e) Von bekannten Substanzen, die als Wachstumsfaktoren für Mikroorganismen in Frage kommen sind Hydroxypyrimidin und Thiazol (zusammen) sowie Cocarboxylase ungefähr gleich wirksam wie Aneurin (mit Hydroxypyrimidin ist ein sehr schwaches Wachstum des Pilzes möglich). Andere wasserlösliche Vitamine, Nukleinsäuren und deren Derivate, Pterine, Aminosäuren und Heteroauxin blieben allein und in verschiedenen Kombinationen auf *Ustilago violacea* wirkungslos.

Aneurin, d. h. seine Komponenten Pyrimidin und Thiazol, sind also für den von uns verwendeten Stamm von *Ustilago violacea* Hauptwachstumsfaktoren (Bestätigung der Angaben von Schopfer und Blumer [40]).

Als Zusatzfaktoren sind die andern untersuchten Verbindungen ebenfalls inaktiv.

Es ist deshalb wahrscheinlich, daß in den Weizenkeim- und Spinatextrakten eine oder mehrere noch nicht identifizierte Bestandteile die Wachstumsförderung verursachen.

f) Durch verschiedenartige Behandlung von Weizenkeim- und Spinatextrakt gelingt eine teilweise Aufteilung der auf *Ustilago violacea* wirksamen Stoffe: ein Anteil verhält sich wie das  $B_1$  und ist unentbehrlich; ein anderer wirkt in erster Linie zusätzlich; er kann den ersten nicht ersetzen.

Seine Eigenschaften sind: Thermostabilität; mehr oder weniger säure- und alkalibeständig; nicht fällbar durch Bleiazetat, dagegen durch Phosphorwolframsäure; langsam oder (unter den gewählten Bedingungen) nicht dialysierend (also nicht niedermolekular); löslich in Wasser und wässrigem Aethanol, in Chloroform möglicherweise, nicht aber in Aether; wird aus wässrigen Lösungen bei pH 4,6 an Fullererde nicht adsorbiert, bei pH 6,7 an Kohle nur teilweise.

Auf Grund der ähnlichen Wirkung auf *Ustilago violacea* und gewisser übereinstimmender Eigenschaften wird angenommen, daß die wirksamen Substanzen des Weizenkeim- und des Spinatextraktes gleichartig sind, möglicherweise aber in den verwendeten Präparaten in verschiedenen Kombinationen vorliegen.

Es scheint nicht ausgeschlossen, daß diese Wachstumsfaktoren in enger Beziehung zum Fermentsystem des B<sub>1</sub> stehen.

## Literatur

1. Berthelot, A.: Nouvelles remarques d'ordre chimique sur la choix des milieux de culture naturels et sur la manière de formuler les milieux synthétiques. — Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 16, 1553; 1934.
2. Bertrand, G.: Sur le rôle capital du manganèse dans la formation des conidies de l'*Aspergillus niger*. — C. r. Acad. Sci. Paris 154, 381; 1912.
3. — et Javillier, M.: Influence du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. — Influence combinée du zinc et du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. — C. r. Acad. Sci. Paris 152, 225 et 900; 1911.
4. Bhagvat, K. and Devi, P.: Inactivation of thiamine by certain food-stuffs and oil seeds. I and II. — Ind. J. Med. Res. 32, 131 and 139; 1944.
5. Blumer, S.: Untersuchungen über die Biologie von *Ustilago violacea* (Pers.) Fuck. I. Mitteilung: Ernährungs- und Kulturbedingungen, Wirkung des Saponins. — Arch. f. Mikrobiol. 8, 458; 1937.
6. — Ueber die Aneurinheterotrophie bei einigen antherenbewohnenden Brandpilzen. — Mitt. Natf. Ges. Bern 1940, 18.
7. — und Schopfer W. H.: Beitrag zur Biologie und Wirkstoffphysiologie von *Ustilago scabiosae* (Sowerby) Winter. — Ber. Schweiz. Bot. Ges. 50, 248; 1940.
8. Brefeld, O.: Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie, Heft IV. — Leipzig 1881.
9. — Botanische Untersuchungen über Hefenpilze. Fortsetzung der Schimmelpilze. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie, Heft V. Die Brandpilze (Ustilagineen). — Leipzig 1883.
10. Cook, E. S., Kreke, C. W., Giersch, C., Schroeder, P.: A growth depressant substance from yeast. — Science 1, 616; 1941.
11. Eddy, W. H., Kerr, R. W., Williams, R. R.: The isolation from autolyzed yeast of a crystalline substance melting at 223°, having the properties of a bios. — J. Amer. Chem. Soc. 46, 2846; 1924.
12. Gerhardt, Fr.: Beiträge zur Kultur phytoparasitischer Pilze auf definierten Nährböden. — Arch. f. Mikrobiol. 13, 380; 1943.
13. Goldschmidt, V.: Vererbungsversuche mit den biologischen Arten des Antherenbrandes (*Ustilago violacea*, Pers.) — Zschr. f. Bot. 21, 1; 1928/29.
14. Hoagland, D. R. and Snyder, W. C.: Nutrition of strawberry plant under controlled conditions: a) Effect of boron and certain other elements; b) Susceptibility to injury from sodium salts. — Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 30, 228; 1933.
15. Hurri H.: Zusatz-Wachstumsfaktoren für *Phycomyces Blakesleeanus*. — Zschr. f. Vitaminforsch. 16, 69; 1945.

16. Javillier, M.: Le zinc chez les plantes. — *Ann. Inst. Pasteur* 22, 720; 1908.
17. Kinnersley, H. W., O'Brien, J. R., Peters, R. A., Reader, V.: Large scale preparations of vitamin B<sub>1</sub> and vitamin B<sub>4</sub> concentrates. — *Biochem. J.* 27, 15; 1933.
18. Krampitz, L. O. and Woolley, D. W.: The manner of inactivation of thiamine by fish tissue. — *J. Biol. Chem.* 152, 9; 1944.
19. Lecoq, R. et Raffy, A.: Etudes sur le germe de blé. I. La composition chimique et la richesse en vitamines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> de la farine de germe de blé actuellement préparée. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 25, 156; 1943.
20. Lucas, G. H. W.: The fractional of bios and comparison of bios with vit. B and C. — *J. Physiol. Chem.* 28, 1180; 1924.
21. Lunde, G.: Vitamine in frischen und konservierten Nahrungsmitteln. — 2. Aufl., Springer Berlin, 1943.
22. Menon, K. P. N.: Studies in the physiology of parasitism. XIV. Comparison of enzymatic extracts obtained from parasitic fungi. — *Ann. of Bot.* 48, 187; 1934.
23. Miller, W. L., Eastcott and Maconachie: Wildiers' bios: The fractionation of bios from yeast. — *J. Amer. Chem. Soc.* 55, 1502; 1933.
24. Mitchell, H. K., Snell, E. E., Williams R. J.: Folic acid I. Concentration from spinach. — *J. Amer. Chem. Soc.* 66, 267; 1944.
25. Moser, W.: Untersuchungen über Wachstumsfaktoren bei Mikroorganismen. Die Trennung der Wirkstoffe vitaminischer Natur des Weizenkeimes. — Diss. phil. II (Botan. Inst.), Bern 1940.
26. Müller, W.: Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenpilzes *Mucor Ramannianus*. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 51, 165; 1941.
27. Narayanan, B. T. and Drummond, J. C.: The concentration of vitamin B<sub>2</sub>. *Biochem. J.* 24, 19; 1930.
28. Polonovski, M., Busnel, R. G., Passon, M.: Propriétés biochimiques des ptérides. — *Helv. Chim. Acta* 29, 1328; 1946.
29. Ranker, E. R.: Synthetic nutrient solutions for culturing *Ustilago zeae*. — *J. Agric. Res.* 41, 435; 1930.
30. Raulin, J.: Etudes chimiques sur la végétation. — *Ann. Sci. Nat., Sér. V*, 11, 93; 1869.
31. Robbins, W. and Kavanagh, F.: Hypoxanthine, a growth substance for *Phycomyces*. — *Proc. Nat. Acad. of Sci.* 28, 4; 1942.
32. Schopfer, W. H.: Recherches sur le facteur de croissance contenu dans le germe de blé. — *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 41, 335; 1932.
33. — Sur le facteur de croissance du germe de blé. Son extraction par l'acétate de plomb et son action sur un champignon. — *Arch. f. Mikrobiol.* 5, 502; 1934.
34. — Vitamines et facteurs de croissance chez les plantes. Recherches sur la solubilité des facteurs de croissance. Le facteur de l'urine. — *Arch. f. Mikrobiol.* 6, 290; 1935.

35. — Un test végétal pour la vitamine B<sub>1</sub>. — *Zschr. f. Vitaminforsch.*, 4, 67; 1935.
36. — Ueber die Einwirkung von Aneurin auf *Ustilago violacea*. — *Ber. Deutsche Bot. Ges.* 55, 572; 1938.
37. — Le problème de la spécificité d'action des vitamines. Etude de quelques analogues de l'aneurine (vitamine B<sub>1</sub>). — *C. r. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève* 58, 58; 1941.
38. — Les hétérovitamines B<sub>1</sub> et leur action sur les microorganismes. — *C. r. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève* 58, 64; 1941.
39. — Les vitamines, facteurs de croissance pour les microorganismes. — {Schweiz. *Zschr. f. Path. u. Bakt.* 7, 314; 1944.
40. — Blumer, S. und Kocher, V.: Untersuchungen über die Biologie von *Ustilago violacea* (Pers.) Fuck. II. Wirkung des Aneurins und anderer Wuchsstoffe vitaminischer Natur. — *Arch. f. Mikrobiol.* 9, 305; 1938.
41. — et Müller, W. F.: Recherches sur la décomposition thermique de l'aneurine. — *C. r. Soc. Biol. Paris* 128, 372; 1938.
42. Signer, R., Hänni, H., Rottenberg, W., von Tavel, P.; Eine Dialysierkolonne zur Zerlegung von Gemischen niedermolekularer Stoffe. — *Helv. Chim. Acta* 29, 1984; 1946.
43. Steinberg, R. A.: The nutritional requirements of the fungus *Aspergillus niger*. — *Bull. Torrey Bot. Club* 62, 81; 1935.
44. — Some effects of the heavy metals essential for the nutrition of *Aspergillus niger* upon its growth. — *Amer. J. Bot.* 23, 227; 1936.
45. — Applicability of nutrient solution. Purification to the study of trace element requirements of *Rhizobium* and *Azotobacter*. — *J. Agric. Res.* 57, 461; 1938.
46. Sure, B.: Studies on phosphatase containing enzyme products for hydrolysis of cocarboxylase in brewers type yeasts and wheat embryo at various hydrogen ion concentrations. — *J. Biol. Chem.* 162, 139; 1946.
47. von Tavel, P.: Eine Dialysierkolonne zur Zerlegung von Gemischen niedermolekularer Stoffe. 2. Mitt. Berechnung von Dialysierkolonnen. — *Helv. Chim. Acta* 80, 334; 1947.
48. Teyssere, Y.: Sur le dosage en forme libre est esterifiée de l'aneurine dans quelques tissus végétaux. — *C. r. Soc. Biol.* 139, 822; 1945.
49. Utiger, H.: Neue Untersuchungen über die Bedingungen der künstlichen Symbiose *Mucor Ramannianus* — *Rhodotorula rubra*. — *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 52, 537; 1942.
50. Vogel, H.: Getreidekeime und Keimöle. — Basel, 1948.
51. Wassink, E. C.: Begrenzende Bedingungen bei der Atmung von *Phycomyces*. — *Rec. Trav. Bot. Neerland.* 31, 504; 1934.
52. Wildiers, E.: Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. — *La Cellule* 18, 311; 1901.
53. Williams, R. J., Eakin, R. E., Snell, E. E.: The relationship of inositol, thiamin, biotin, pantothenic acid and vitamin B<sub>6</sub> to the growth of yeast. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 62, 1204; 1940.

## Inhalt

	Seite
<b>1. Einleitung und Fragestellung</b> .....	53
a) Ernährungsbedingungen für <i>Ustilago violacea</i> .....	53
b) Fragestellung .....	55
<b>2. Grundversuche</b> .....	56
a) Methodik .....	56
b) Die optimale B <sub>1</sub> -Dosis .....	57
c) Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration .....	58
d) Pektin als Kohlenstoffquelle .....	60
<b>3. Untersuchungen mit verschiedenen Extrakten</b> .....	63
a) Vergleich einiger natürlicher Extrakte .....	63
b) Wirkung von Eigenextrakten auf <i>Ustilago violacea</i> .....	65
<b>4. Extrakt-Aschen und Spurenelementmischungen (Pseudowachstumsfaktoren mineralischer Natur)</b> .....	67
a) Extrakt-Aschen .....	67
b) Künstliche Spurenelementmischungen .....	69
<b>5. Untersuchungen mit bekannten organischen Wirkstoffen</b> .....	71
a) Pyrimidin und Thiazol .....	71
b) Aneurin-Analoga .....	73
c) Andere Wirkstoffe und Kombinationen verschiedener Substanzen .....	74
<b>6. Behandlung der wirksamen Extrakte</b> .....	77
a) Hitze-, Säure- und Laugebehandlung .....	77
b) Bleiazetat- und Phosphorwolframsäurefällung, Kohleadsorption im Weizenkeimextrakt .....	79
c) Dialyse des Weizenkeimextraktes .....	83
d) Aether- und Chloroformauszüge des Spinatextraktes .....	86
e) Kohle-, Fullererde- und Aluminiumoxydadsorptionen im Spinatextrakt..	88
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	90
Literatur .....	93