Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und

Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 41 (1950)

**Heft:** 3-4

Artikel: Mikrobiologische Vitamin- und Aminosäurebestimmungen : Vorschläge

der eidg. Lebensmittelbuch-Kommission

Autor: Wiss, O.

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-983745

#### Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

#### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

#### Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

**Download PDF:** 14.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

# 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 blakesleeanus 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 Standarddose 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 anderseits, ermöglicht eine quantitative Auswertung.

# Vitaminbestimmungen

Bestimmung des Lactoflavins (Vitamin B2)
Methode nach Snell und Strong 1) mit Lactobacillus casei e 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 alkalisiert. 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-ţantothenat, Pyridoxin (B<sub>6</sub>), Nicotinsäure (PP): Je 10 mg Capantothenat, Pyridoxin und Nicotinsäure werden in je 100 cm<sup>3</sup> 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 25 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> werden in 250 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Haltbarkeit im Eisschrank unbeschränkt.
- 10. Salzlösung B: 10 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,5 g NaCl, 0,5 g FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O und 0,5 g MnSO<sub>4</sub> · 4 H<sub>2</sub>O werden in 250 cm<sup>3</sup> 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	$cm^3$
1-Cystinlösung	25	${\rm cm}^3$
dl-Tryptophanlösung	25	$cm^3$
Hefeauszug	20	$\rm cm^3$
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	10	$\rm cm^3$
Xanthinlösung	10	$cm^3$
Ca-pantothenatlösung	1	$cm^3$
Nicotinsäurelösung	1	$\rm cm^3$
Pyridoxinlösung	1	$cm^3$
p-Aminobenzoesäurelösung	4	$cm^3$
Salzlösung A	5	$\rm cm^3$
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.

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

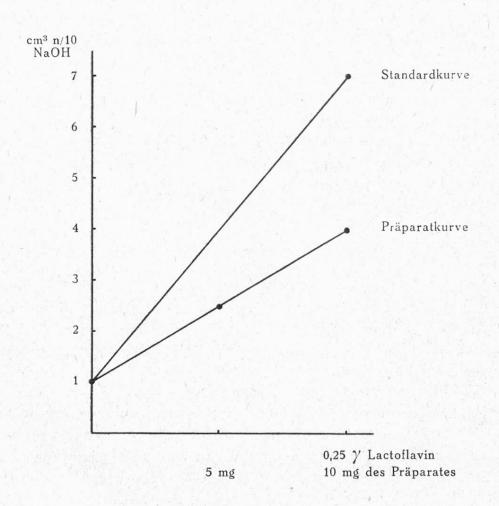
Impflösung: In 2 Zentrifugengläser von 15 bis 20 cm³ Inhalt werden 5 cm³ Nährlösung, 2,5 cm³ Standardlösung und 2,5 cm³ Wasser gegeben. Die Zentrifugengläser werden mit Wattepfropfen verschlossen und während 10 Minuten bei 115° C sterilisiert. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur werden die Ansätze mit 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  $0.5 \text{ cm}^3$   $(0.05 \text{ }\gamma), 1.0 \text{ cm}^3$   $(0.1 \text{ }\gamma), 1.5 \text{ cm}^3$   $(0.15 \text{ }\gamma), 2.0 \text{ cm}^3$   $(0.2 \text{ }\gamma)$ 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 1150 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 37º 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 Extraktdosen durch einfaches Ablesen aus

der Standardkurve ermittelt und daraus der Mittelwert errechnet. Die einzelnen Werte sollten nicht mehr als ± 10 % voneinander abweichen. Eine lineare Kurve, oder zumindest eine Kurve, die im Bereich der Extraktdosen 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 cm³ n/10 NaOH. Die grösste Standarddose von 0,25 γ verbraucht durchschnittlich 7,0 cm³ n/10 NaOH. 7,0—1,0 ergibt diejenige Laugemenge, die 0,25 γ entspricht. 1 γ ist somit 24 cm³ n/10 NaOH gleichzusetzen.

Die kleine Extraktdose, die 5 mg des untersuchten Ausgangsmaterials enthält, verbraucht 2,5 cm³ n/10 NaOH, die grosse Extraktdose, die 10 mg enthält, verbraucht 4,0 cm³ n/10 NaOH. Demnach entsprechen 5 mg (10—5) einer Laugemenge von 1,5 cm³, 1 g demnach 300 cm³.

Resultat: 300 cm³ : 24 cm³ = 12,5  $\gamma$  B2 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 Stammlösungen werden noch folgende benötigt:

- 1. Uitaminfreies 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 cm<sup>3</sup> 85 % igem Athanol 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 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> 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 Natriumacetat (wasserhaltig)

20 g

33 g

<sup>\*)</sup> Bezogen von der Firma Dr. A. Wander, Bern.

<sup>\*\*)</sup> Bezogen von der Firma F. Hoffmann-La Roche, Basel.

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

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. Extraktdosen: 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).

<sup>\*)</sup> 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 36 6)

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:

Natriumacetat (wasserhaltig) 10	0
Manual Co. ( )	œ
Natriumchlorid 5	8
Peptonlösung vgl. S. 227 200	$cm^3$
	$cm^3$
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	$cm^3$
Pyridoxinlösung vgl. S. 228 1	$cm^3$
Nicotinsäurelösung vgl. S. 228	$cm^3$
[18] [18] [18] [18] [18] [18] [18] [18]	$cm^3$
p-Aminobenzoesäurelösung vgl. S. 228	$cm^3$
Folsäurelösung 0,5	$cm^3$
Salzlösung A vgl. S. 228 5	$\rm cm^3$
Salzlösung B vgl. S. 228 5	$cm^3$

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  C erhitzt, filtriert und mit  $40^{\circ}$ /oiger 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-

<sup>\*)</sup> 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 0,5-0/0igem Acetatpuffer von pH = 4,5 aufgenommen, mit je 20 mg Papain und Taka-Diastase versetzt und während 24 Stunden bei 370 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  $(0.0075 \text{ y}), 2.0 \text{ cm}^3 (0.01 \text{ y}), 3.0 \text{ cm}^3 (0.015 \text{ y}), 4.0 \text{ cm}^3 (0.02 \text{ y}) \text{ und } 5.0 \text{ cm}^3$ (0,025 γ) der Standardlösung. Extraktdosen: 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 mu 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 Extraktdose 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	$3,0^{-0}/_{0}$
Asparagin	1,0 %0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 %0
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 %0
Agar	$3,0^{-0}/_{0}$
Trockenhefe	$3.0^{-0}/_{0}$

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			g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,75	g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O		0,25	g
Hypoxanthin		0,25	mg
Vitamin Free Casamino Acids (Difco) *)		7,5	_
1-Cystinlösung *)	vgl. S. 227		$cm^3$
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung *)	vgl. S. 227	10	$cm^3$
Lactoflavinlösung (Stammlösung) *)	vgl. S. 228	4	$\rm cm^3$
Ca-pantothenatlösung *)	vgl. S. 228	1	$cm^3$
Pyridoxinlösung *)	vgl. S. 228	1	$\rm cm^3$
Nicotinsäurelösung *)	vgl. S. 228	1	$cm^3$
Biotinlösung *)	vgl. S. 231	4	$\rm cm^3$
p-Aminobenzoesäurelösung *)	vgl. S. 228	1	$cm^3$
Folsäurelösung 1:5 verdünnt*)	vgl. S. 233	0,5	$cm^3$
Salzlösung A*)	vgl. S. 228	5	$\rm cm^3$
Salzlösung B *)	vgl. S. 228	5	$\rm cm^3$
바다 살아가지 않는데 그리고 말했다. 그렇게 되는데 그리고 있는데 그리고 있는데 그리고 있는데 그리고 있다.			

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.

<sup>\*)</sup> 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. B<sub>1</sub>-Bestimmung nach Sarett und Cheldelin (Seite 234). In 1 cm<sup>3</sup> des Extraktes soll jedoch ca. 0,1 γ B<sub>1</sub> 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 Extraktdosen 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 115° C gehalten. Dabei erfolgt eine teilweise Spaltung des Aneurins in Pyrimidin- und Thiazolanteil. Die Bestimmung wird im Gegensatz zur Lactobacillusmethode 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—20° C gehalten. Dann wird das Mycel durch Abnutschen von der Nährlösung abgetrennt, mit Wasser ausgewaschen, ca. 2 Stunden bei 120° 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 Extraktdosen ermittelt.

Bestimmung des Pyridoxins (Vitamin B6) Methode nach Stokes und Mitarbeitern 9) mit Neurospora sitophila 299 10)

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 30°C gehalten, anschliessend bei 4°C aufbewahrt.

Nährlösung: 500 cm³ Nährlösung enthalten:

Saccharose	15,0 g
Ammoniumtartrat	5,0 g
Natriumcitrat	$4,0   \mathrm{g}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.5 g
NaCl	0.1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g

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

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

Fyridoxinstandardlösung: 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 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> 10 n-Natronlauge und 5 cm<sup>3</sup> einer frisch bereiteten 1 <sup>0</sup>/<sub>0</sub>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 y 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

<sup>\*)</sup> 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. Extraktdosen: 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 Pantothensäure

Methode nach Skeggs und Wright 11) mit Lactobacillus arabinosus 17/5 12)

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	$25,0 \text{ cm}^3$
dl-Tryptophanlösung	vgl. S. 227	$25,0 \text{ cm}^3$
Adenin+Guanin+Uracil-Lösung	vgl. S. 227	$10,0 \text{ cm}^3$
Aneurinlösung	vgl. S. 231	$10,0 \text{ cm}^3$
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	$40,0 \text{ cm}^3$
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	$10,0 \text{ cm}^3$
Pyridoxinlösung	vgl. S. 228	$20,0 \text{ cm}^3$
p-Aminobenzoesäurelösung	vgl. S. 228	$1,0 \text{ cm}^3$
Biotinlösung	vgl. S. 231	$4,0 \text{ cm}^3$
Salzlösung A	vgl. S. 228	$5,0 \text{ cm}^3$
Salzlösung B	vgl. S. 228	$5,0 \text{ cm}^3$

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.

<sup>\*)</sup> 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 Pantothensäurenährlösung, welcher pro cm³ 0,2 γ Pantothensäure 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 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: 1 g des zerkleinerten Materials wird 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 abgekühlt, auf 50 cm³ 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 cm³ ca. 0,02 γ Pantothensäure enthalten sind.

Durchführung der Bestimmungen: Vgl. B2-Versuch Seite 229. Standardansätze: 0,2 cm³ (0,01 γ), 0,4 cm³ (0,02 γ) 0,8 cm³ (0,04 γ), 1,2 cm³ (0,06 γ), 1,6 cm³ (0,08 γ), 2,0 cm³ (0,1 γ), 2,4 cm³ (0,12 γ) und 3,0 cm³ (0,15 γ) der Pantothensäurestandardlösung. Extraktdosen: 1,0, 2,0 und 4,0 cm³. Der Leerwert enthält neben der Nährlösung 5 cm³ Wasser.

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

## Bestimmung von Biotin

Methode nach E. C. Barton-Wrigth 13) mit Lactobacillus arabinosus 17/5 14)

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

Nährlösung: 500 cm3 Nährlösung enthalten:

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

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

<sup>\*\*)</sup> 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.

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

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  C erhitzt, filtriert und mit  $40^{\circ}/_{\circ}$ 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 mγ) 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 mγ 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 mγ), 1,5 cm³ (0,15 mγ), 1,75 cm³ (0,175 mγ), 2,0 cm³ (0,2 mγ), 2,5 cm³ (0,25 mγ) und 5,0 cm³ (0,5 mγ) der Biotinstandardlösung. Extraktdosen: 1,0, 2,0 und 4,0 cm³.

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

#### Bestimmung von Folsäure

Methode nach Capps und Mitarbeitern 15) mit Streptococcus lactis R 16)

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 <sup>0</sup>/<sub>0</sub> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,0 <sup>0</sup>/<sub>0</sub> 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
1-Cystinlösung	vgl. S. 227	25	$cm^3$
dl-Tryptophanlösung	vgl. S. 227	25	$cm^3$
Adenin + Guanin + Uracil-Lösung	vgl. S. 227	10	${\rm cm^3}$
Aneurinlösung	vgl. S. 231	10	$cm^3$
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	40	${\rm cm}^3$
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  $100^{\circ}$  C erhitzt, filtriert und mit  $40^{\circ}$ oiger 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 mγ) Folsäure enthält.

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

<sup>\*)</sup> 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Je 10 cm³ werden in Zentrifugengläser eingefüllt und geimpft. Nach Bebrütung während 24 Stunden bei 37°C werden die Röhrchen 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 1º/₀iger 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 37º C gehalten. Dann wird die Lösung neutralisiert, 15 Minuten bei 120º C im Autoklaven gehalten und so verdünnt, dass 1 cm³ ca. 2 mγ Folsäure enthält.

Durchführung der Bestimmungen: Ausführung im Prinzip wie beim B<sub>1</sub>-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 B<sub>1</sub>-Versuch.

Auswertung: Vgl. Vitamin B1-Bestimmung Seite 234.

Bestimmung von p-Aminobenzoesäure Methode nach *Landy* und *Dicken* <sup>17</sup>) mit Acetobacter suboxydans <sup>18</sup>)

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

 $\begin{array}{c} 0.5 \ ^{0}/_{0} \ \text{Hefeextrakt (Difco)} \\ 5.0 \ ^{0}/_{0} \ \text{Glycerin} \\ 2.0 \ ^{0}/_{0} \ \text{Agar} \end{array} \right\} \ \text{auf pH} = 6 \ \text{einstellen}.$ 

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)
Glycerin
1-Tryptophan
1-Cystin
50 g
100 mg
75 mg

Salzlösung A	vgl. S. 228	$5 \text{ cm}^3$
Salzlösung B	vgl. S. 228	$5 \text{ cm}^3$
Ca-pantothenatlösung	vgl. S. 228	$10 \text{ cm}^3$
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	$10 \text{ cm}^3$

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  C erhitzt, filtriert und auf pH = 6 eingestellt.

- p-Aminobenzoesäurestandardlösung: 10 mg p-Aminobenzoesäure 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-Aminobenzoesäure enthält.
- Impflösung: Zur Bereitung der Impflösung wird p-Aminobenzoesäurenährlösung verwendet. Pro 5 cm³ werden 0,05 γ p-Aminobenzoesäure 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-Aminobenzoesäure enthalten sind.
- Durchführung der Bestimmungen: Ausführung im Prinzip wie beim B<sub>1</sub>-Versuch (Seite 234). Standardansätze: 0,5 cm³ (0,01 mγ), 1,0 cm³ (0,02 mγ), 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. 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: 48 Stunden bei 30° C. Ermittlung des Trübungswertes wie beim B<sub>1</sub>-Versuch.

Auswertung: Vgl. Vitamin B1-Bestimmung Seite 234.

#### Bestimmung von Inosit

Methode nach G. W. Beadle 19) mit Neurospora crassa 37401a 20)

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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,5	g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O		0,25	g
NaCl		50,0	mg
CaCl <sub>2</sub>		50,0	mg
Rohrzucker		10,0	g
Biotinlösung	vgl. S. 231	25,0	$cm^3$

Spurenelemente (als Salze zugegeben):

$H_3BO_3$	28	γ	d.h.	1	${\rm cm}^3$	einer	2,8	$mg^0/_0$	Lösung
CuSO <sub>4</sub>	175	γ	<b>»</b>	1	${\rm cm}^3$	<b>»</b>	17,5	$mg^0/_0$	»
FeSO <sub>4</sub>	500	Υ	<b>»</b>	1	$cm^3$	<b>»</b>	50,0	$mg^0/_0$	»
MnSO <sub>4</sub>	40	γ	<b>»</b>	1	$cm^3$	» »	4,0	$mg^0/_0$	»
$MoO_3$	15	γ	<b>»</b>	1	${\rm cm^3}$	<b>»</b>	1,5	$mg^0/_0$	»
$ZnSO_4$	4,43	mg	» »	1	$cm^3$	»	0,44	$43^{-0/\theta}$	»

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  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 % iger steriler Kochsalzlösung suspendiert.

Bereitung der Extrakte des zu untersuchenden Materials: Das zerkleinerte Material wird mit 18 % iger 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. Extraktdosen: 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

<sup>\*)</sup> 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,5	g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O		0,25	g
NaCl		50,0	mg
CaCl <sub>2</sub>		50,0	mg
Rohrzucker		10,0	g
Biotinlösung	vgl. S. 231	25,0	$cm^3$

Spurenelemente (als Salze zugegeben):

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28	γ.		d.h.	1	$\rm cm^3$	einer	2,8	$mg^0/0$	Lösung
CuSO <sub>4</sub>	175	γ		<b>»</b>	1	$\rm cm^3$	»	17,5	$mg^0/_0$	» ·
FeSO <sub>4</sub>	500	γ		»	1	$\rm cm^3$	»	50,0	$mg^0/_0$	»
MnSO <sub>4</sub>	40	γ		»	1	$cm^3$	<b>»</b>	4,0	$mg^0/o$	»
MoO <sub>3</sub>	15	γ	i la linguista. Ma	»	1	$cm^3$	<b>»</b>	1,5	$mg^0/_0$	»
ZnSO <sub>4</sub>	4,43	mg		»	1	$cm^3$	<b>»</b>	0,44	$\frac{13}{9}$	»

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  C erhitzt, filtriert und auf pH = 5.5 eingestellt.

Cholinstandardlösung: 5 mg Cholin werden in 1000 cm³ Wasser gelöst, so dass  $1 \text{ cm}^3$  5  $\gamma$  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, zerkeinerten Materials werden mit 10 cm³ 30/0 iger Schwefelsäure während 2 Stunden bei 1200 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

Nolumen 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 % ojer Natriumchloridlösung gewaschen und die Filtrate verworfen. Das adsorbierte Cholin wird aus dem Permutit mit 10 cm³ 5% ojer 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 Mitarbeitern 23) 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 <sup>3</sup>
dl-Tryptophanlösung	vgl. S. 227	$25,0 \text{ cm}^3$
Adenin+Guanin+Uracil-Lösung	vgl. S. 227	$10,0 \text{ cm}^3$
Xanthinlösung	vgl. S. 227	$0.5 \text{ cm}^3$
Aneurinlösung	vgl. S. 231	$10,0 \text{ cm}^3$

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

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

- *Uitamin B12-Standardlösung:* 1 Ampulle B12 (= 1  $\gamma$  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 m $\gamma$  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 B<sub>12</sub> durch Erhitzen zerstört wird, wird nur die B<sub>12</sub>-freie Nährlösung im Autoklaven während 5 Minuten bei 115°C gehalten. Standardlösung und zu analysierender Extrakt werden durch Filtration mit dem Seitz-Filter sterilisiert <sup>25</sup>).
- 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 Extraktdosen ermittelt und der Durchschnittswert errechnet.

<sup>\*)</sup> 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 enteiweisste 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 enteiweissende Extrakt wird mit je 1/8 des Extraktvolumens 10 % iger Natriumwolframatlösung und 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. 2 stündigem Stehen wird zentrifugiert, im Filtrat das Ouecksilber 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 1-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 <sup>25a</sup>).

# 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 0,5 % Bacto-Pepton (Difco) 1,0 % Natriumacetat (wasserhaltig) 1,25 cm³ Salzlösung A vgl. S. 228 einstellen 1,25 cm³ 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
1-Cystin *)	200 mg
dl-Methionin	200 mg
dl-Tryptophan	400 mg
l-Tyrosin *)	200 mg

<sup>\*)</sup> Cystin und Tyrosin müssen, bevor sie zur Nährlösung zugegeben werden, gelöst werden:

Cystin: pro 100 mg 1 cm<sup>3</sup> 2 n-Salzsäure. Tyrosin: pro 100 mg 1 cm<sup>3</sup> n-Natronlauge.

dl-Phenylalanin			200	mg
dl-Glutaminsäure			200	mg
dl-Threonin			200	mg
dl-Alanin			200	mg
dl-Asparaginsäure			200	mg
1-Lysin			100	
1-Arginin			200	mg
1-Histidin			200	
dl-Serin			200	
1-Prolin			200	mg
1-Oxyprolin			200	mg
dl-Norleucin			200	mg
Glykokoll			200	mg
Glucose			10	g
Natriumacetat (wasserhaltig)			10	
Adenin+Guanin+Uracil-Lösung vg	gl. S.	227	10	$cm^3$
Ca-pantothenatlösung vg	gl. S.	228	2	$cm^3$
Lactoflavinlösung (Stammlösung) vg	gl. S.	228	8	$cm^3$
Aneurinlösung	gl. S.	231	2	$cm^3$
Nicotinsäurelösung	gl. S.	228	2	$cm^3$
Pyridoxaminlösung			4	$cm^3$
p-Aminobenzoesäurelösung vg	gl. S.	228	0,4	$cm^3$
Biotinlösung	gl. S.	231	2	$cm^3$
Folsäurelösung (Stammlösung) vg	gl. S.	233	1	$cm^3$
Salzlösung A vg	gl. S.	228	5	$cm^3$
Salzlösung B vg	gl. S.	228	5	$\rm cm^3$
	10 10 11			

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  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:

1-Valin	0	2	4	8	12	16	20	25	30	35	40	
	in part								60	80	100	γ
l-Histidin	0	2	4	6	8	10	12	16	20	30		γ
1-Arginin	0	2	4	8	12	16	20	25	30	40	50	Υ
l-Lysin	0	10	15	20	30	40	50	60	80	100		Υ
1-Tryptophan	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	2,0	2,5	Y
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 Extraktdosen ermittelt und der Durchschnittswert errechnet.

# Bestimmung von Asparaginsäure und Glutaminsäure bzw. Glutamin

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

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:

1-Arginin			100	mg
1-Cystin **)			100	mg
Glykokoll			100	mg
l-Histidin			100	mg
1-Oxyprolin			100	mg
1-Leucin			100	mg
1-Lysin			100	mg
1-Prolin			100	
1-Tryptophan ***)			100	mg .
L-Tyrosin **)			100	mg
l-Asparaginsäure			400	mg
1-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		$cm^3$
Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S.	228		$cm^3$
p-Aminobenzoesäurelösung	vgl. S.	228		$cm^3$
Aneurinlösung	vgl. S.	231	5	$cm^3$
Cholin			2,5	mg
Inosit				mg
Pyridoxinlösung †)	vgl. S.	228	100	$cm^3$
Adenin+Guanin+Uracil-Lösung	vgl. S.	227	10	$cm^3$

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

<sup>\*\*)</sup> Cystin und Tyrosin: vgl. S. 249.

<sup>\*\*\*)</sup> Für Glutaminsäurebestimmung nur die Hälfte.

<sup>†)</sup> Für Glutaminsäurebestimmung nur 1/10.

Xanthinlösung	vgl. S. 227	$10 \text{ cm}^3$
Salzlösung A *)	vgl. S. 228	$10 \text{ cm}^3$
Salzlösung B	vgl. S. 228	$5 \text{ cm}^3$
Ammoniumsulfat		3 g
Natriumacetat (wasserhaltig)		10 g
Glucose		10 g

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  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	$\rm cm^3$
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.

<sup>\*)</sup> Für Asparaginsäurebestimmung 4fache Menge.

#### Standardwerte:

l-Asparaginsäure 5 10 15 20 40 50 1-Glutaminsäure 5 10 20 30 40 60 80 100 120 150

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:

1-Arginin	200	mg
l-Asparaginsäure	100	mg
1-Asparagin	400	mg
1-Cystein	50	mg
1-Glutaminsäure	300	mg
Glykokoll	100	-
1-Histidin		mg
dl-Isoleucin	250	mg
dl-Leucin	250	mg
1-Lysin	200	mg
dl-Methionin	100	mg
dl-Phenylalanin	100	
1-Prolin	100	_
dl-Serin	50	mg
dl-Threonin	200	mg
dl-Tryptophan	40	mg
1-Tyrosin **)	100	
dl-Valin	250	mg
Glucose	25	
Natriumacetat	20	-
2018년 : 10 1일 : 12 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20		23

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

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

	3	g
vgl. S. 228	6	$cm^3$
vgl. S. 228	5	${\rm cm^3}$
vgl. S. 227	10	${\rm cm^3}$
vgl. S. 227	10	$cm^3$
vgl. S. 231	5	${\rm cm^3}$
vgl. S. 228	10	$cm^3$
vgl. S. 228	5	$\rm cm^3$
vgl. S. 228	20	${\rm cm^3}$
vgl. S. 228	10	$cm^3$
vgl. S. 228	1	$cm^3$
vgl. S. 231	10	$cm^3$
vgl. S. 233	5	$\rm cm^3$
	-0.1	$\rm cm^3$
	vgl. S. 228 vgl. S. 227 vgl. S. 227 vgl. S. 231 vgl. S. 228	vgl. S. 228 6 vgl. S. 228 5 vgl. S. 227 10 vgl. S. 227 10 vgl. S. 227 5 vgl. S. 231 5 vgl. S. 228 10 vgl. S. 228 5 vgl. S. 228 20 vgl. S. 228 10 vgl. S. 228 10 vgl. S. 228 10 vgl. S. 228 10 vgl. S. 228 5

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  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 4 n-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 y 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.

<sup>\*)</sup> 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 Mitarbeitern 34) mit Leuconostoc mesenteroides P-60 35)

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
1-Arginin			120	mg
l-Asparagin			600	mg
1-Cystin *)			80	mg
1-Glutaminsäure			200	mg
1-Histidin			20	mg
1-Oxyprolin			80	mg
dl-Isoleucin			120	mg
1-Leucin			80	mg
1-Lysin			120	mg
dl-Methionin			60	mg
dl-Norleucin			80	mg
dl-Norvalin				mg
dl-Phenylalanin			120	mg
1-Prolin				mg
1-Tyrosin *)				mg
dl-Serin				mg
dl-Threonin			400	
1-Tryptophan				mg
dl-Valin		M Maria	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	
Aneurinlösung	vgl. S.			$cm^3$
Pyridoxinlösung	vgl. S.	228		$cm^3$
Ca-pantothenatlösung	vgl. S.	228	20	$cm^3$

<sup>\*)</sup> Cystin und Tyrosin: vgl. S. 249.

Lactoflavinlösung (Stammlösung)	vgl. S. 228	80	$cm^3$
Nicotinsäurelösung	vgl. S. 228	20	${\rm cm^3}$
Biotinlösung	vgl. S. 231	50	${\rm cm}^3$
Folsäurelösung (Stammlösung)	vgl. S. 233	1	$cm^3$
p-Aminobenzoesäurelösung			
(1000fach verdünnt)	vgl. S. 228	1	$cm^3$

Die frisch bereitete Lösung wird auf  $100^{\circ}$  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:

1-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
1-Isoleucin	0	5	10	20	30	40	60	80	100			Υ
1-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).

<sup>2</sup>) 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.

<sup>5</sup>) 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).

<sup>10</sup>) Stamm Nr. 9276 der American Type Culture Collection.

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.

<sup>12</sup>) Stamm Nr. 8014 der American Type Culture Collection.

<sup>13</sup>) 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.

<sup>14</sup>) Stamm Nr. 8014 der American Type Culture Collection.

<sup>15</sup>) 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).

<sup>16</sup>) Stamm Nr. 8043 der American Type Culture Collection.

<sup>17</sup>) M. Landy und D. M. Dicken, J. Biol. Chem. **146**, 109 (1942).

<sup>18</sup>) Stamm Nr. 621 der American Type Culture Collection.

<sup>19</sup>) G. W. Beadle, J. Biol. Chem. **156**, 683 (1944).

<sup>20</sup>) Stamm Nr. 9683 der American Type Culture Collection.

<sup>21</sup>) N. H. Horowitz und G. W. Beadle, J. Biol. Chem. **150**, 325 (1943).

<sup>22</sup>) Stamm Nr. 9277 der American Type Culture Collection

<sup>23</sup>) B. F. Capps, N. L. Hobbs und S. H. Fox, J. Biol. Chem. 178, 517 (1949).

<sup>24</sup>) Stamm Nr. 4797 der American Type Culture Collection.

- <sup>25</sup>) C. E. Hoffmann, E. L. R. Stokstad, B. L. Hutchings, A. C. Dornbush und Th. H. Jukes, J. Biol. Chem. 181, 635 (1949).
- <sup>25a</sup>) M. S. Dunn und L. B. Bockland, Advances in Protein Chemistry (Academic Press Inc., Publishers, New York, N.Y.) 3, 295 (1947).
- <sup>26</sup>) J. L. Stokes, M. Gunness, J. M. Dwyer und M. C. Caswell, J. Biol. Chem. **160**, 35 (1945).
- <sup>27</sup>) Stamm Nr. 9790 der American Type Culture Collection.
- <sup>28</sup>) L. R. Hac und E. E. Snell, J. Biol. Chem. **159**, 291 (1945).

<sup>29</sup>) Stamm Nr. 8042 der American Type Culture Collection.

<sup>30</sup>) L. R. Hac, E. E. Snell und R. J. Williams, J. Biol. Chem. **159**, 273 (1945).

<sup>31</sup>) 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.