

# ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

64. Jahrgang · Nr. 18 · Seite 493–520 · 21. September 1952

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

## Vitamine der Milch

Von Prof. Dr. RICHARD KUHN, Heidelberg<sup>1)</sup>  
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung Heidelberg

Die Ausgestaltung der Chromatographie zur präparativen Reindarstellung organischer Substanzen, die am Beispiel des Carotins erfolgte, stand im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Vitamingehalt der Milch. An dem aus Kuhmilch isolierten Lactoflavin wurde erkannt, daß Vitamine im Tierkörper als Bausteine von Fermenten benötigt werden. In der Frauenmilch finden sich N-haltige Saccharide, die als Wuchsstoff für eine von Paul György entdeckte Mutante des *L. Bifidus* wirken. Als Spaltstücke wurden N-Acetyl-d-glucosamin, L-Fucose, d-Galactose und d-Glucose identifiziert. Besonders reich an diesem Wuchsstoff sind das Colostrum und das Meconium.

Normalerweise leben alle Säugetiere nach ihrer Geburt kürzere oder längere Zeit ausschließlich von der Milch der Mutter. Offenbar enthält die Muttermilch alles, was für das Gedeihen des Neugeborenen wesentlich ist.

Als W. Stepp<sup>2)</sup> in Straßburg sowie F. G. Hopkins<sup>3)</sup> in England versucht haben, junge Mäuse aufzuziehen mit einer Nahrung, die aus alkohol-extrahiertem Brot bzw. aus gereinigtem Eiweiß, Fett und Kohlehydrat sowie aus Mineralsalzen bestand, zeigte es sich, daß das nicht möglich ist. Die Tiere gingen ein. Sie entwickelten sich dagegen gut, wenn man ihnen überdies noch Milch gab. Das durfte man mehr oder minder erwarten. Unerwartet aber war, daß schon erstaunlich geringe Mengen von Milch („astonishingly small amounts“) ausreichend waren, um den Tieren das zuzuführen, was man damals als akzessorische Nährstoffe<sup>3)</sup> bezeichnete und was bald darauf die Bezeichnung Vitamine<sup>4)</sup> erhalten hat.

Am Beispiel der Milch ließe sich das meiste darlegen, was wir von diesen lebenswichtigen Stoffen seither gelernt haben. Die Aufteilung in die fettlöslichen Vitamine, die beim Zentrifugieren in den Rahm gehen, und in die wasserlöslichen Vitamine, die in der Magermilch verbleiben; Methoden der Reindarstellung, Konstitutionsaufklärung und Synthese; Einblicke in die Wirkungsweise; Heilerfolge bei Mangelkrankheiten und vieles andere mehr.

Von den Vitaminen der Milch kann man zwei unmittelbar wahrnehmen, da es sich um Farbstoffe handelt: Erstens das Carotin, das fettlöslich ist und der Butter die gelbe Farbe verleiht; zweitens das Lactoflavin, das wasserlöslich ist und die grünstichig gelbe Farbe der Molke bedingt.

Es ist nicht meine Absicht hier sämtliche in der Milch vorkommenden Vitamine aufzuzählen und in langen Zahlen-tabellen den Einfluß der Nahrung und die jahreszeitlichen Schwankungen, die Unterschiede von Milch zu Milch bei den einzelnen Tierarten und Probleme der molkerotechnischen Verarbeitung zu erörtern. Was mir vor-

schwebt, sind Rückblicke und Ausblicke, die zeigen sollen, wie manche wissenschaftlichen Erkenntnisse auf dem Gebiete der Milch weitere Gebiete der Chemie und der Medizin beeinflußt haben. Als Beispiele liegen mir das Carotin, das Lactoflavin und ein bisher unbekannter Faktor der Frauenmilch am nächsten.

### I. Carotin; chromatographische Methoden

Das Carotin war 1831 von H. W. F. Wackenroder<sup>5)</sup> kristallisiert erhalten worden; nicht aus Butter, sondern aus Karotten. Seine Wachstumswirkung hat 1929 H. v. Euler<sup>6)</sup> erkannt. Als Vorstufe des Vitamins A ist es für das Verständnis der ersten Mäuseversuche von Stepp und Hopkins von besonderer Bedeutung geworden.

In einer Untersuchung mit E. Lederer<sup>7)</sup> gelang es 1931, das Carotin in zwei wohldefinierte Komponenten zu zerlegen, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin benannt wurden. Gemeinsam mit H. Brockmann<sup>8)</sup> kam später das  $\gamma$ -Carotin hinzu. Das angewandte Verfahren war das der chromatographischen Adsorption. Die außerordentliche Leistungsfähigkeit dieser Methode geht daraus hervor, daß es sich um die Trennung von Kohlenwasserstoffen gehandelt hat, die alle die gleiche Bruttoformel  $C_{40}H_{56}$  besitzen.

Das Prinzip der Chromatographie war bereits C. F. Schönbein (1861)<sup>9)</sup> und M. Tswett (1903)<sup>10)</sup> bekannt gewesen: Die Trennung von Stoffgemischen beim Aufsteigen einer Lösung in Papier sowie beim Durchlaufen durch Säulen, die mit einem Adsorptionsmittel beschickt sind. Aber es war nur gelegentlich als „qualitatives Untersuchungsmittel“ bei analytischen Beobachtungen angewendet worden. Die Trennung des Carotins in seine Komponenten hat gezeigt, daß es sich für die präparative Reindarstellung organischer Substanzen eignet.

<sup>1)</sup> Geigers Magazin Pharm. 33, 141 [1831].

<sup>2)</sup> B. v. Euler, H. v. Euler u. P. Karrer, Helv. chim. acta 12, 278 [1929].

<sup>3)</sup> R. Kuhn u. E. Lederer, Ber. dtsh. chem. Ges. 64, 1349 [1931]; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 200, 246 [1931]; R. Kuhn u. H. Brockmann, ebenda 200, 255 [1931].

<sup>4)</sup> R. Kuhn u. H. Brockmann, Ber. dtsh. chem. Ges. 66, 407 [1933].

<sup>5)</sup> Über eine neue Kategorie von Adsorptionserscheinungen und ihre Anwendung in der biochemischen Analyse, Arb. Naturf. Ges. Warschau 14 [1903]; Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt, Warschau 1910 (russisch); Ber. Dtsch. Bot. Ges. 24, 316, 384 [1906]; Ber. dtsh. chem. Ges. 44, 1124 [1911].

<sup>1)</sup> Vortrag anlässlich des Kongresses der Nobelpreisträger für Chemie am 24. Juni 1952 in Lindau.

<sup>2)</sup> W. Stepp, Biochem. Z. 22, 451 [1909]; Naturwiss. 11, 33 [1923].

<sup>3)</sup> F. G. Hopkins, Analyst 31, 385 [1906]; Journ. Physiol. 49, 425 [1912].

<sup>4)</sup> C. Funk, Journ. State Med. 20, 341 [1912]; Die Vitamine, Wiesbaden, 1914.

Seither hat dieses Verfahren eine kaum mehr zu überschreitende Fülle von Anwendungen gefunden<sup>11, 12, 13</sup>). An seiner Ausgestaltung waren aus dem Kreise des eigenen Instituts A. Winterstein, H. Brockmann und Th. Wieland besonders erfolgreich. Es ist auf wasserlösliche, auf fluoreszierende und farblose Substanzen ausgedehnt worden, auf Flüssigkeiten und Gase. Die Chromatographie hat sich auch in der anorganischen Chemie als wertvolles Hilfsmittel erwiesen. Trennungen von seltenen Erden, denen hervorragende Chemiker Jahrzehnte ihres Lebens gewidmet hatten, lassen sich heute in verhältnismäßig kurzer Zeit chromatographisch ausführen, und dasselbe gilt für die erst in jüngster Zeit künstlich gewonnenen Elemente jenseits des Urans. Für die Erforschung organischer Naturstoffe sowie für zahllose Probleme der Biologie und Medizin hat die von R. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin<sup>14</sup>) in England neugeschaffene Methode der Papierchromatographie sich als geradezu unersetzt erwiesen. Auch sie ist bereits in vielen Richtungen methodisch ausgestaltet und weiter entwickelt worden<sup>15</sup>).

Man hat sich mehrfach darüber gewundert, daß ein so einfaches und vielseitig anwendbares Verfahren so lange unbeachtet bleiben konnte. Insbesondere darüber, daß die von M. Tswett für Blattauszüge beschriebene Methodik nicht schon von R. Willstätter bei seinen Untersuchungen über Chlorophyll präparativ ausgestaltet und angewandt worden ist. Dazu möchte ich folgendes sagen: R. Willstätter kannte die Versuche von Tswett; er hat auch die von diesem beschriebene Trennung der Chlorophylle a und b nachgearbeitet, aber er hat die Methodik verworfen. Der Grund war, daß beide Komponenten des Blattgrüns bei der Adsorption an Calciumcarbonat, an Aluminiumoxyd usw. eine chemische Veränderung erleiden, die Tswett entgangen war. Der für die intakten Chlorophylle charakteristische Farbumschlag nach Braun auf Zusatz von Alkali, die sog. braune Phase, geht verloren. Unter den zahlreichen Adsorptionsmitteln, die Tswett vorgeschlagen hatte, befand sich allerdings auch Rohrzucker, an dem, wie A. Winterstein<sup>16</sup>) später gezeigt hat, die Chlorophylle intakt bleiben. Gerade dieses Adsorbens scheint bei der Nachprüfung unbeachtet geblieben zu sein.

## II. Lactoflavin; Vitamine als Bausteine von Fermenten

Von sämtlichen Vitaminen, die in der Milch vorkommen, ist bisher nur ein einziges auch wirklich aus Milch erstmals isoliert worden. Es hat den Namen Lactoflavin<sup>17</sup>) erhalten; die Angelsachsen nennen es Riboflavin.

Es kommt in der Natur teils frei vor, z. B. in der Kuhmilch, teils als Baustein von Flavoproteinen, d. h. von gelb gefärbten Eiweißkörpern, so in der Leber und in Hefe. Das freie Lactoflavin dialysiert leicht und fluoresziert lebhaft gelbgrün. Die Flavoproteine sind nicht dialysierbar und zeigen keine Fluoreszenz. In den mit P. György und Th. Wagner-Jauregg ausgeführten Untersuchungen hat sich gezeigt, daß die Wirksamkeit als Vitamin bei peroraler Gabe an Ratten unabhängig davon ist, ob Bindung an Eiweiß vorliegt oder nicht<sup>18</sup>). Um die als Einheit definierte

<sup>11)</sup> L. Zechmeister u. L. v. Chotnoky: Die chromatographische Adsorptionsmethode, Wien, Springer-Verlag, 1937.

<sup>12)</sup> H. Brockmann, Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie, Verlag Chemie, 1944, S. 547ff.

<sup>13)</sup> E. Beyer, Arch. Pharm. 285, 57, 129 [1952].

<sup>14)</sup> Biochem. Journ. 38, 224 [1944].

<sup>15)</sup> F. Cramer: Papierchromatographie, Verlag Chemie, 1952.

<sup>16)</sup> A. Winterstein u. G. Stein, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 220, 263 [1934].

<sup>17)</sup> R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, Ber. dtsh. chem. Ges. 66, 1034 [1933]; C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>; R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, ebenda 66, 1950 [1933].

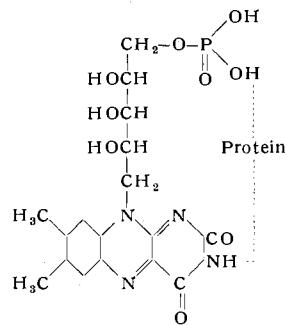
<sup>18)</sup> P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 223, 241 [1934].

Gewichtszunahme der Tiere von 40 g in 30 Tagen zu erzielen, wurden 10 γ Lactoflavin pro Tag benötigt. Für das mit F. Weygand synthetisch<sup>19)</sup> erhaltene Lactoflavin ergab sich derselbe Wert.

Durch Arbeiten von Otto Warburg<sup>20)</sup> war bekannt, daß in der Hefe ein gelbes Ferment vorkommt. Es beteiligt sich an der Oxydation von Glucose-6-phosphorsäure zu Gluconsäure-6-phosphorsäure, so daß seine Aktivität am Sauerstoff-Verbrauch gemessen werden konnte. Das neue kristallisierte Vitamin der Milch bildete beim Belichten dassele inaktive chloroformlösliche Spaltstück<sup>21</sup>), das O. Warburg aus Lösungen seines gelben Ferments erhalten hatte.

So kamen wir zu der Vorstellung, daß das Vitamin Baustein des Ferments ist<sup>22</sup>). Und weil die Fermente als Katalysatoren schon in sehr geringen Mengen große stoffliche Umsätze bewirken, wurde es erstmals begreiflich, daß auch Vitamine bereits in „astonishingly small amounts“ zu wirken vermögen.

Gemeinsam mit F. Weygand und H. Rudy ließ sich die wechselseitige Beziehung zwischen Vitamin und Ferment eingehender klarlegen. H. Theorell<sup>23)</sup> hatte gezeigt, daß das gelbe Ferment umkehrbar in eine farblose Eiweißkomponente und in einen Phosphorsäure-ester des Lactoflavins zerlegt werden kann. In einer über viele Zwischenstufen führenden, eindeutigen Synthese gelang die Totalsynthese der Lactoflavin-5'-phosphorsäure<sup>24</sup>), und wir konnten sie mit der natürlichen Eiweißkomponente zum katalytisch voll wirksamen Ferment (I) vereinigen<sup>25</sup>):



Formel I. Gelbes Ferment

Dabei erkannten wir, daß auch das Lactoflavin selbst Affinität zur Eiweißkomponente besitzt. Nur ist die so entstehende katalytisch wirksame Verbindung viel stärker dissoziiert. Man braucht einen großen Überschuß an freiem Lactoflavin, um sich denjenigen Reaktionsgeschwindigkeiten zu nähern, für die eine ganz geringe, nämlich stöchiometrische Menge an Lactoflavin-5'-phosphorsäure genügt (Bild 1).

Diese Versuche machten die Bedeutung des Phosphorsäure-Restes für die Bindung an den spezifischen Eiweißkörper anschaulich. Aus synthetischen, in der Natur nicht vorkommenden Flavinen wurden künstliche Verbindungen mit der Eigenschaft von Fermenten erhalten.

In der Natur sind bisher verschiedene gelbe Fermente gefunden worden, die sich vom Lactoflavin ableiten. Sie

<sup>19)</sup> R. Kuhn, K. Reinemund, F. Weygand u. R. Ströbele, Ber. dtsh. chem. Ges. 68, 1765 [1935].

<sup>20)</sup> O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 254, 438 [1932]; 266, 377 [1933]; O. Warburg: Wasserstoffübertragende Fermente, W. Saenger, Berlin 1948, S. 9ff.

<sup>21)</sup> Synthese: R. Kuhn, K. Reinemund u. F. Weygand, Ber. dtsh. chem. Ges. 67, 1460 [1934]; R. Kuhn u. K. Reinemund, ebenda 67, 1932 [1934].

<sup>22)</sup> R. Kuhn, Mitt. der Kaiser-Wilhelm-Ges. 2, 13 [1933]; P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Naturwiss. 21, 560 [1933].

<sup>23)</sup> Biochem. Z. 275, 37, 344 [1934]; 278, 263 [1935].

<sup>24)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, Ber. dtsh. chem. Ges. 69, 1543 [1936].

<sup>25)</sup> R. Kuhn u. H. Rudy, ebenda 69, 1974, 2557 [1936].

alle sind befähigt, wie dieses in umkehrbarer Weise Wasserstoff aufzunehmen und abzugeben. Das Reduktions-Oxidations-Potential wird, wie wir gefunden haben, durch die Bindung an Eiweiß wesentlich geändert<sup>26)</sup>. Die letzten Rätsel der Spezifität sind noch lange nicht gelöst.

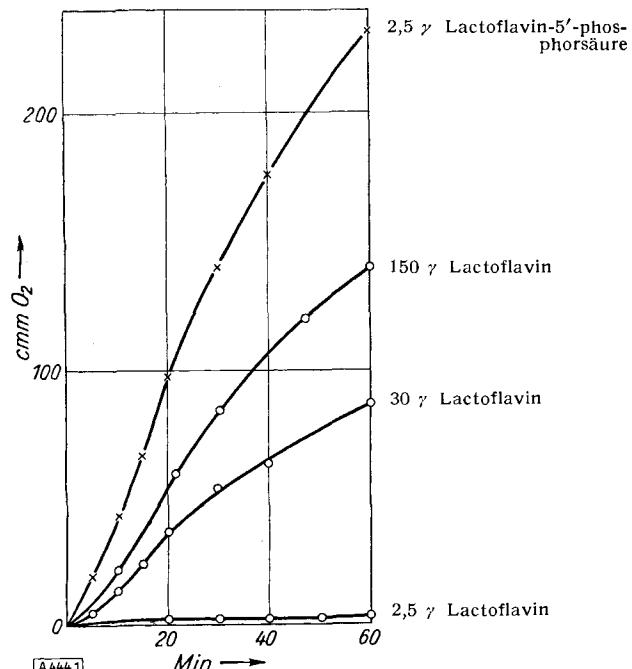


Bild 1  
Co-Ferment-Wirkung von Lactoflavin<sup>25)</sup>

Daß Vitamine Bausteine von Cofermenten bzw. von Fermenten sind, hat sich in der Folgezeit noch an weiteren Beispielen beweisen lassen. So ist das Vitamin B<sub>1</sub> Vorstufe eines Ferments, das aus  $\alpha$ -Ketosäuren CO<sub>2</sub> abspaltet, das Vitamin B<sub>6</sub> eines solchen, das Aminosäuren decarboxyliert, und die Verallgemeinerung geht so weit, daß schon mit dem Nachweis eines neuen Vitamins auch die Frage aufgetaucht ist, in welchem Ferment man es als Baustein antreffen werde. Für fettlösliche Vitamine ist die Richtigkeit einer solchen Betrachtungsweise nicht gesichert. Man weiß zwar durch neuere Untersuchungen von G. Wald, daß in unserer Netzhaut eine cis-Form des aus Vitamin A gebildeten Aldehyds mit einem spezifischen Eiweißkörper unter Bildung des Sehpurpurs reagiert, es ist aber auch erwiesen, daß das nicht die einzige Funktion ist, die dem Vitamin A in unserem Körper zufällt.

### III. Milchsäure-Bakterien

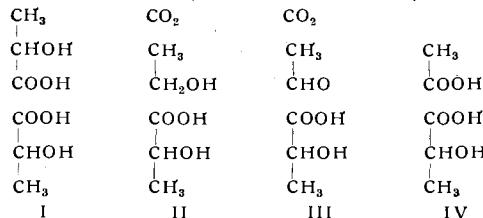
Das Lactoflavin ist nicht nur ein Vitamin für höhere Tiere und für den Menschen. Es ist auch ein Wuchsstoff für zahlreiche Milchsäure-Bakterien, deren Tätigkeit in Erscheinung tritt, wenn die Milch sauer wird. Dabei wird aus dem Zucker der Milch Milchsäure gebildet. Die Milchsäure-Bildung aus Kohlehydrat spielt auch eine bedeutende Rolle in unserer Muskulatur, wenn Arbeit geleistet wird. Der Chemismus dieser Reaktion ist in einer langen Reihe von bewunderungswürdigen Untersuchungen von Otto Meyerhof klargelegt worden. Wenn ich darüber spreche, dann tue ich es, um Worte zu übermitteln, die dieser große Physiologe kurz vor seinem unerwarteten Tode zu mir gesagt hat, und um das Verständnis zu erleichtern für einen Milchsäure-bildenden Mikroorganismus, der uns heute noch eingehend beschäftigen soll.

<sup>26)</sup> R. Kuhn u. P. Boulanger, Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 1557 [1936].

Nach einem alten Satz A. v. Baeyers geht der Sauerstoff bei organischen Verbindungen bevorzugt dorthin, wo schon Sauerstoff ist. Im Falle des Traubenzuckers steht das C-Atom 1, das aldehydische, auf der höchsten Oxidationsstufe. Es wäre daher naheliegend, daß im Falle der alkoholischen Gärung aus dem C-Atom 1 das CO<sub>2</sub> und im Falle der Milchsäure-Gärung aus dem C-Atom 1 eine Carboxyl-Gruppe der Milchsäure entsteht. Nach O. Meyerhof ist das nicht der Fall. Nach ihm werden bei der alkoholischen Gärung die beiden Mole CO<sub>2</sub> aus den C-Atomen 3 und 4 des Traubenzuckers gebildet, die C-Atome 1 und 6 liefern die Methyl-Gruppen für die beiden Molekülen Alkohol. Bei dem Zerfall in 2 Mole Milchsäure findet man die C-Atome 3 und 4 als Carboxyl-Gruppen, die C-Atome 1 und 6 als Methyl-Gruppen. In jüngster Zeit haben all diese Schlußfolgerungen von O. Meyerhof durch Anwendung von radioaktiver Glucose, bei der entweder das C-Atom 1 oder die C-Atome 3 und 4 indiziert waren, eine glänzende und unmittelbare Bestätigung gefunden<sup>27)</sup>.

Im letzten Jahr erschien aber eine Arbeit von Gunsalus<sup>27a)</sup> über einen Mikroorganismus (*L. mesenteroides*), der den Traubenzucker in 1 Mol Milchsäure + 1 Mol Alkohol + 1 Mol CO<sub>2</sub> verwandelt, also halb alkoholische und halb Milchsäuregärung. Hier fand sich, wenn das C-Atom 1 radioaktiv war, praktisch alle Aktivität im gebildeten CO<sub>2</sub> — also im Sinne A. v. Baeyers, wenn Sie so sagen wollen. Die Schlußfolgerung von O. Meyerhof war, daß sein Schema voraussichtlich auf die sog. homofermentativen Milchsäurebakterien beschränkt bleibt, d. h. auf diejenigen, die nur Milchsäure (2 Mole) bilden. Daß dagegen bei den heterofermentativen Milchsäure-Bildnern grundsätzlich andere Wege von der Natur beschritten werden, die noch eingehend zu erforschen sein werden.

#### Homofermentative und heterofermentative Milchsäure-Bildung



I: Homofermentative Milchsäure-Bildung.

II: *L. mesenteroides* (Gunsalus)

III: *Allomyces* (Schema unbewiesen) } heterofermentativ

IV: *L. Bifidus* (Schema unbewiesen) }

Tabelle 1

### IV. *Lactobacillus Bifidus*

Zu den heterofermentativen Milchsäure-Bildnern gehört, wie die Übersicht zeigt, auch der *L. Bifidus*, den H. Tissier<sup>28)</sup> in Paris 1899 aus dem Stuhl von brustgenährten Säuglingen isoliert hat. Um seine nähere Erforschung hat sich der Heidelberger Kinderkliniker E. Moro<sup>29)</sup> Verdienste erworben. Beim gesunden Brustkind beherrscht der *L. Bifidus* die Darmflora nahezu gänzlich. Er ist grampositiv und färbt sich leuchtend rot, wenn man ihn nach Hotchkiss<sup>29a)</sup> erst mit NaJO<sub>4</sub> und anschließend mit Fuchsin-schwefeliger Säure behandelt. Sein Name bringt zum Ausdruck, daß es sich um Stäbchen handelt, die an den Enden gegabelt sind. Die mikroskopische Betrachtung einer

<sup>27)</sup> Vgl. z. B. P. V. Vittorio, G. Kratkov u. G. B. Reed, Science (New York) 115, 567 [1952].

<sup>27a)</sup> R. D. de Moss, R. C. Bard u. J. C. Gunsalus, J. Bacteriol. 62, 499 [1951]; I. C. Gunsalus u. M. Gibbs, J. biol. Chemistry 194, 871 [1952].

<sup>28)</sup> H. Tissier: Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson, Paris, 1900.

<sup>29)</sup> E. Moro, Über die nach Gram farbbaren Bacillen des Säuglingsstuhles, Wien, Klin. Wschr. 13, 114 [1900].

<sup>29a)</sup> Arch. Biochem. 16, 139 [1948].

Zellsuspension mutet mitunter an wie der Blick in eine Buchstabensuppe, in der lauter große Ypsilonen herumschwimmen.

Der *L. Bifidus* ist anaerob. Er unterliegt leicht Veränderungen, bei denen die Ypsilonen in gerade Stäbchen übergehen und nicht mehr optisch aktive sondern racem. Milchsäure gebildet wird. Vor drei Jahren ist es zum ersten Mal gelungen ein Klon zu züchten, d. h. Kulturen zu gewinnen, die sich von einer einzigen Mutterzelle ableiten. Im Anschluß daran ist von Paul György eine Mutante des *L. Bifidus* aus dem Stuhl eines brustgefütterten Säuglings isoliert worden, die nur wuchs, wenn man dem Nährboden Frauenmilch zusetzte. Kuhmilch erwies sich als unwirksam. Diese Mutante hat zunächst die Laboratoriums-Nummer 212 A gehabt. Sie ist später unter der Bezeichnung *L. Bifidus var. Penn* registriert worden. Penn ist die Kurzform für die University of Pennsylvania in Philadelphia an der die Isolierung geglückt ist.

Wenn sich auch noch nicht abschätzen ließ, welche Bedeutung das Wuchsstoffbedürfnis einer solchen Mutante für die Gesamtdarmflora des Säuglings haben könnte, so hat doch die Entdeckung von P. György ein wichtiges Gebiet der Kinderheilkunde durch neue Fragestellungen bereichert und belebt. Vor allem hat sie zu einem Test geführt, mit Hilfe dessen es möglich wurde, chemisch einem Wirkstoff der Frauenmilch nachzuspüren<sup>30)</sup>.

Der Test<sup>31)</sup> wird unter streng anaeroben Bedingungen vorgenommen. Die Atmosphäre besteht aus einem Gemisch von 90% N<sub>2</sub> und 10% CO<sub>2</sub>. Nach Zumischung von etwas Wasserstoff wird durch glühenden Platindraht der letzte Rest an Knallgas verbrannt. Die Nährlösung hat folgende Zusammensetzung (Tabelle 2).

Substanz	in 1 Liter
Lactose (Milchzucker) .....	35 g
Natriumacetat (wasserfrei) .....	25 g
dl-Alanin .....	200 mg
l-Cystin .....	200 mg
dl-Tryptophan .....	200 mg
l-Asparagin .....	100 mg
Adenin .....	10 mg
Guanin .....	10 mg
Xanthin .....	10 mg
Uracil .....	10 mg
Casein-hydrolysat (NZ Case, Sheffield) .....	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	200 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	10 mg
NaCl .....	10 mg
MnSO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .....	7 mg
Vitamin B <sub>1</sub> (Aneurinchlorid-chlorhydrat) .....	200 γ
Vitamin B <sub>2</sub> (Lactoflavin) .....	200 γ
Vitamin B <sub>6</sub> (Adermin-chlorhydrat) .....	1200 γ
Pantothenäsäure (Calciumsalz) .....	400 γ
p-Aminobenzoësäure .....	10 γ
Folsäure .....	10 γ
Biotin .....	4 γ
Ascorbinsäure (nach dem Autoklavieren) .....	1 g

Tabelle 2  
Nährlösung für *L. Bifidus*

Sie ist „halb“-synthetisch, da sie Kaseinhydrolysat enthält. Als Maß des Wachstums der Mutante dient die Menge der gebildeten Säure, die man mit n/10 NaOH potenti-

<sup>30)</sup> Die folgenden Angaben entstammen Untersuchungen, die von P. György u. R. Kuhn gemeinsam mit Dr. A. Gauhe, J. R. E. Hoover, M. A., R. F. Norris, M. D., C. S. Rose, Ph. D., Dr. H. W. Ruelius, Dr. G. F. Springer u. Dr. F. Zilliken ausgeführt wurden. P. György trug darüber am 9. Mai 1952 auf dem Annual Meeting of the American Pediatric Society in Old Point Comfort, Va., vor. Sein Vortrag wurde in der Samstag-Ausgabe der New York Times vom 10. Mai 1952 (p. 23) referiert.

<sup>31)</sup> Vgl. R. F. Norris, T. Flanders, R. M. Tomarelli u. P. György, The isolation and cultivation of *Lactobacillus Bifidus*, a comparison of branched and unbranched strains, Journ. Bacteriol. 60, 681 [1950]; R. M. Tomarelli, R. F. Norris u. P. György, Journ. Biol. Chemistry 181, 879 [1949].

metrisch titriert. Unter diesen Bedingungen findet man, daß Kuhmilch nur etwa 1/50 der Wirksamkeit von Frauenmilch besitzt (Tabelle 3).

Zusatz	auf 10 cm <sup>3</sup>	Titration cm <sup>3</sup> n/10 NaOH
Kein Zusatz (Leerwert) .....		0,4 cm <sup>3</sup>
Frauen-Milch (entrahmt) .....	0,02 cm <sup>3</sup> 0,06 cm <sup>3</sup> 0,20 cm <sup>3</sup>	2,2 cm <sup>3</sup> 7,9 cm <sup>3</sup> 12,5 cm <sup>3</sup>
Kuh-Milch (entrahmt) .....	0,10 cm <sup>3</sup> 0,30 cm <sup>3</sup> 1,00 cm <sup>3</sup>	0,6 cm <sup>3</sup> 0,8 cm <sup>3</sup> 2,3 cm <sup>3</sup>

Tabelle 3  
Säurebildung in 40 Stunden nach Zusatz von Frauenmilch und Kuhmilch

Bei allen untersuchten reinen Pflanzenfressern war die Milch sehr wenig aktiv. Am wirksamsten ist die allererste Milch der Frau, das sog. Colostrum (Tabelle 4).

Species	Wirk- samkeit	1 Einheit in	relative Wirk- samkeit
Meerschweinchen .....	0	—	—
Kuh .....	(+)	2,5 cm <sup>3</sup>	2,5
Schaf .....	(+)	2,5 cm <sup>3</sup>	2,5
Ziege .....	(+)	1,5 cm <sup>3</sup>	4
Schwein .....	+	0,6 cm <sup>3</sup>	10
Pferd .....	+	0,5 cm <sup>3</sup>	12
Kuh-Colostrum .....	++	0,15 cm <sup>3</sup>	40
Ratte .....	++	0,13 cm <sup>3</sup>	45
Ratten-Colostrum .....	++	0,03 cm <sup>3</sup>	200
Mensch .....	++	0,06 (0,02–0,15) cm <sup>3</sup>	100
Menschl. Colostrum .....	++	0,015 (0,01–0,02) cm <sup>3</sup>	400

Tabelle 4  
Vergleich von Frauenmilch mit der Milch verschiedener Tiere

Bei der Kuh fällt die Aktivität des Colostrums sehr schnell ab. Schon am vierten Tage nach der Geburt findet man nur noch wenig mehr Wirksamkeit als in späteren Wochen. Bei der Frau vollzieht sich dieser Abfall langsamer und führt für längere Zeit zu einem verhältnismäßig konstanten Wuchsstoffspiegel, der im Durchschnitt bei 0,06 cm<sup>3</sup>/Einheit liegt. Die Unterschiede von Mutter zu Mutter sind im allgemeinen gering. An zwei Frauen, die ein ganzes Jahr gestillt haben, fiel es auf, daß noch 6–9 Wochen nach der Geburt die sehr hohe Aktivität von 0,02 cm<sup>3</sup>/E gefunden wurde, wie man sie sonst nur bei Colostrum antrifft. Am Ende des Jahres, d. h. vor dem Abstellen, war die Aktivität auf 0,08 bis 0,12 cm<sup>3</sup>/E abgesunken.

Neben Colostrum und Milch sind besonders reich an *Bifidus*-wuchsstoff. Das Meconium, d. h. der Darminhalt des Neugeborenen, das sog. Kindspech, sowie das Sperma des Mannes. Stierhoden und Stiersperma sind praktisch unwirksam. Reich sind die Magenschleimhaut des Menschen, des Schimpansen und des Schweines. Auch menschliche Tränen. Bei den in der Tabelle 5 angeführten Werten ist zu berücksichtigen, daß Milch nahezu 12% Trocken gewicht, die Tränenflüssigkeit aber durchschnittlich nur 0,5% organische Substanz enthält. Auf letztere bezogen kommen Menschentränen der Frauenmilch gleich. Kaninchentränen waren unwirksam.

Colostrum .....	0,01–0,02 cm <sup>3</sup> (Mittel: 0,015)
Milch .....	0,02–0,15 cm <sup>3</sup> (Mittel: 0,06)
Meconium (10 %ige Suspension) .....	0,05 cm <sup>3</sup>
Sperma .....	0,07 cm <sup>3</sup>
Magensaft .....	0,45 cm <sup>3</sup>
Speichel .....	0,03–3,0 cm <sup>3</sup> (Mittel: 0,5)
Harn .....	0,10–1,0 cm <sup>3</sup>
Tränen .....	1,0 cm <sup>3</sup>
Fruchtwasser .....	1,0 cm <sup>3</sup>
Ovarialzyste (Flüssigkeit) .....	6,0 cm <sup>3</sup>

Tabelle 5. Verteilung der *Bifidus*-Wuchsstoffe im Menschen

Von den in Tabelle 6 angeführten Substanzen vermochte keine den *Bifidus*-wuchsstoff zu ersetzen.

1. Methylamin · HCl	12. D-Arginin
2. Thioharnstoff	13. Citrullin
3. Dicyanamid	14. $\beta$ -Alanin
4. Guanidin	15. Pantethin
5. Colamin · HCl	16. L-Asparagin
6. Cholin-chlorid	17. D-Glutaminsäure
7. Kreatin	18. Glutathion
8. Allantoin	19. Pyridoxal
9. Orotsäure	20. Pyridoxamin
10. Uridin	21. Cobalamin ( $B_{12}$ )
11. Carnitin	22. Citrovorum-Faktor

Tabelle 6  
Inaktive Substanzen

Der *Bifidus*-Faktor der Frauenmilch ist wasserlöslich. Nach dem Zentrifugieren findet man die gesamte Aktivität in der Magermilch. Er ist bei neutraler Reaktion kochbeständig<sup>32)</sup>. Bei der Dialyse durch Cellophan wird die Außenlösung wirksam. Wenn die Frauenmilch von Fett, von Eiweiß und von Mineralsalzen befreit ist, findet sich die Aktivität in der kristallinischen Rohlactose. Verarbeitet man Kuhmilch auf genau gleiche Art, so erhält man einen kristallinischen rohen Milchzucker, der inaktiv ist. In dieser Phase der Arbeit sind zahlreiche bekannte Kohlehydrate und Derivate von solchen ausgetestet worden (Tabelle 7). Sie haben sich alle als unwirksam erwiesen.

1. D-Glucose	11. D-Mannozuckers.-lacton
2. D-Galactose	12. D-Glucurons.-lacton
3. D-Fructose	13. D-Zuckersäure
4. L-Fucose	14. Schleimsäure
5. Saccharose	15. Lävulinsäure
6. Maltose	16. Oxymethyl-furfurol
7. Lactose	17. Alginsäure
8. Allolactose	18. Alginsäure-sulfat
9. Reducton	19. Pektinsäure
10. Kojisäure	20. Pektin (Citrus; von hohem und niedrigem Mol-Gewicht)

Tabelle 7

Kohlehydrate und verwandte Verbindungen, die keine Wuchsstoffwirkung für *L. Bifidus* var. *Penn* besitzen

Widerspruchsvolle Ergebnisse wurden erhalten, als mit F. Zilliken die Beständigkeit gegen heiße verdünnte Mineralsäuren geprüft wurde. In manchen Versuchen ging die Aktivität der Rohlactose aus Frauenmilch völlig verloren, in anderen schien sie zuzunehmen. Dieser Widerspruch fand folgende Lösung: Wenn die zur Hydrolyse verwendete Säure vor dem Test mit Natronlauge oder mit Kalilauge neutralisiert wurde, dann waren die Lösungen inaktiv. Wurde dagegen mit Ammoniak neutralisiert, so nahm die Aktivität zu. Je konzentrierter die Säure war, desto mehr Ammoniak wurde zum Neutralisieren benötigt und desto größer wurde die Wirksamkeit.

So kam man zu der Erkenntnis, daß das Ammonium-Ion Wuchsstoff für die Penn-Mutante des *L. Bifidus* ist. Reinstes Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Di-ammonophosphat, Ammoniumacetat usw. vermögen im Test die Wirkung der Frauenmilch zu ersetzen. 2–3 mg

<sup>32)</sup> Dadurch unterscheidet er sich wesentlich von einem *Bifidus*-Faktor, über den F. Petuely u. G. Kristen, Ann. Paed. 172/3, 183 [1949], Österr. Ztschr. Kinderheilkunde und Kinderfürsorge 4, 121 [1950], 6, 173 [1951] Angaben gemacht haben. Dieser soll äußerst empfindlich und in abgepumpter etwa 24 Stunden alter Frauenmilch nicht mehr nachweisbar sein. Auch soll er nicht als Wuchsstoff für *L. Bifidus* wirken, sondern das Milieu im Darm irgendwie umstimmen. F. Petuely, Umschau 51, 424 [1951] schreibt, es sei ihm „gelungen, ein Bi-erzeugendes Prinzip in ganz geringen Mengen auf synthetischem Wege zu gewinnen, ohne die chemische Natur des Stoffes und des natürlichen Faktors vorläufig noch näher zu kennen“.

Ammonium-Ion bzw. 10 mg Ammoniumsulfat entsprechen 1 Einheit. Da 1 l menschliches Colostrum 100000 Einheiten enthält, müßte man aber 100000 mal 10 mg, d. h. 1 kg Ammoniumsulfat in 1 l Kuhmilch einröhren, um dieser die Wirksamkeit bester Frauenmilch zu erteilen. Diese Berechnung zeigt klar, daß der *Bifidus*-wuchsstoff der Frauenmilch nicht einfach Ammonsalz sein kann.

Die Aktivität der Ammonium-Ionen hat nun nach zwei Richtungen weitergeführt. Einerseits wurde es verständlich, daß auch manche Säureamide wie Harnstoff oder Glutamin unter gewissen Bedingungen wirksam sind, nämlich dann, wenn diese Substanzen zusammen mit der Nährösung sterilisiert werden, nicht aber wenn man sie erst nach dem Erhitzen im Autoklaven in steril filtrierter Lösung zusetzt. Es kommt eben beim Autoklavieren zur Abspaltung von Ammoniak. Damit ist eine Fehlerquelle aufgedeckt worden, die z. B. bei Wuchsstoff-Bestimmungen im Harn wesentlich ist.

Andererseits war es bereits das dritte Erlebnis, in dem das Ammonium-Ion als spezifischer mikrobiologischer Wuchsstoff in Erscheinung trat. Am Heidelberger Institut hatte schon vor Jahren E. F. Möller<sup>33)</sup> gefunden, daß aus Vitamin B<sub>6</sub> beim Autoklavieren mit Ammoniak ein neuer Wuchsstoff gebildet wird, der später den Namen Pyridoxamin erhalten hat, und daß bei bestimmten Bakterien dieses Pyridoxamin unentbehrlich ist, d. h. nicht durch Vitamin B<sub>6</sub> ersetzt werden kann. Th. Wieland und E. F. Möller<sup>34)</sup> hatten ferner gezeigt, daß bei der Biosynthese des Vitamins Pantothenäsäure durch verarmte Hefezellen Ammonium-Ionen spezifisch und unbedingt nötig sind. Bei der Bildung von Pyridoxamin aus Vitamin B<sub>6</sub> wird eine OH-Gruppe durch eine NH<sub>2</sub>-Gruppe ersetzt. Es war daher naheliegend daran zu denken, daß auch in den *Bifidus*-Zellen die Ammonium-Ionen nur als Vorstufe für den Aufbau einer viel wirksameren – Stickstoff-haltigen – Substanz verwendet werden.

Der kristalline rohe Milchzucker aus Frauenmilch ist Stickstoff-haltig. Der N-Gehalt liegt in der Größenordnung von 0,05%. Mit steigendem N-Gehalt nimmt die Wirksamkeit zu. Zur Abtrennung des Milchzuckers sind drei Verfahren entwickelt worden. Das erste, von F. Zilliken gefunden, beruht auf Adsorption an Kohle und fraktionierten Elutionen, wobei 20 proz. Essigsäure nötig war. Das zweite (A. Gauhe) ist ebenfalls ein Adsorptionsverfahren, bei dem man aber schon mit 5 proz. Essigsäure und Alkohol auskommt. Das dritte (H. W. Ruelius) führt schließlich, ohne jede Adsorption und unter Vermeidung jeglicher Säure, nur durch systematische Anwendung von Lösungsmitteln zum Ziel.

Die so gewonnenen Lactose-freien Präparate sind mit 200–300 γ pro Einheit wirksam. Sie sind frei von Schwefel und Phosphor, frei von Peptiden und Aminosäuren. Sie geben keine Reaktion mit Ninhydrin und sind, im Gegensatz zur Lactose, linksdrehend,  $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$  bis  $-50^\circ$  (Wasser). Mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erhält man Peracetyl-Verbindungen, aus denen durch Verseifung mit methanolischem NH<sub>3</sub> die volle *Bifidus*-Wirksamkeit zurückgewonnen wird. Hydrolyse mit verd. Säuren zerstört die Aktivität restlos. Als einziges N-haltiges Spaltstück ließ sich, zunächst papierchromatographisch, Glucosamin nachweisen. Galactosamin wurde nicht gefunden. Im Test ist Glucosamin bis zu hohen Konzentrationen unwirksam, aber N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-galactosamin zeigen eine deutliche, wenn auch nur

<sup>33)</sup> E. F. Möller, Fiat Review of German Science, Biochemistry 4, 130 [1948].

<sup>34)</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 272, 232 [1941].

geringe Wirksamkeit. Bezogen auf gleiche Stickstoff-Mengen sind sie etwa 30 mal weniger wirksam als die Präparate aus Frauenmilch (Tabelle 8).

Substanz	mg/E	% N	$\gamma$ N/E
Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) .....	2	77,8	1560
N-Acetyl-D-glucosamin .....	2–3	5,9	120–180
N-Acetyl-D-galactosamin ...	2–3	5,9	120–180
Präparate aus Frauenmilch .	0,2–0,3	1,7–2,2	4–5

Tabelle 8. Aktivität und Stickstoffgehalt von Substanzen, die als Wuchsstoff für *L. Bifidus* var. *Penn* wirken

In Untersuchungen aus dem Anfang der Dreißiger Jahre hatten *M. Polonovski* und *A. Lespagnol*<sup>35)</sup> in Paris über ein Kohlehydrat aus Frauenmilch berichtet, dem sie den Namen Gynolactose gaben. Das Vorkommen eines solchen Disaccharides konnten wir nicht feststellen. Die französischen Forscher hatten aber bereits bemerkt, daß ihre sog. Gynolactose von einer Stickstoff-haltigen Substanz begleitet wurde, der sie keine weitere Beachtung schenkten. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese *Bifidus*-wuchsstoff war.

Aus eigenen Präparaten sind von *A. Gauhe* als Spaltstücke kristallisiert erhalten, durch Analyse, Mischschmelzpunkt und Röntgenaufnahmen identifiziert worden: 1) D-Glucosamin als Chlorhydrat, 2) L(-)-Fucose als Diphenylhydrazone, 3) D-Galactose als Methylphenylhydrazone und als Schleimsäure. Das vierte Spaltstück ist D-Glucose, das fünfte ist Essigsäure.

Das Glucosamin macht etwa 20% des Gewichts aus. Es ist in Form der N-Acetyl-Verbindung eingebaut. Bei der Oxydation mit Chromsäure erhält man auf 1 N-Atom 2 Mole Essigsäure. Davon entstammt das eine der Fucose, das andere den Acetylglucosamin-Resten.

Chromatographisch konnten die Präparate in höher und niedriger molekulare Komponenten zerlegt werden, deren Aktivität und N-Gehalt nur wenig differiert. Eine dieser Komponenten unterscheidet sich allerdings von allen anderen dadurch, daß sie nicht links-, sondern rechtsdrehend und frei von Fucose ist. Man findet sie auch, wenn man unter Vermeidung jeder Spur von Säure arbeitet. Sie scheint als solche in der Frauenmilch vorzukommen.

Wenn man Kuhmilch in genau gleicher Weise enteiweißt und weiter verarbeitet, findet man weder N-haltige Saccharide noch *Bifidus*-Wirksamkeit in vergleichbarer Menge.

Wichtig ist, daß bei weitem nicht alle sonstigen Polysaccharide und Oligosaccharide, die Acetylglucosamin-Reste enthalten, *Bifidus*-wirksam sind (Tabelle 9 und 10). Es kommt offenbar auf eine bestimmte Bindungsweise der Acetylglucosamin-Reste an. Die folgenden Zahlen geben an, wieviel Substanz 1 Einheit entspricht.

0,6 mg Blutgruppensubstanz A (Sharp & Dohme)  
0,5 mg Blutgruppensubstanz B (Sharp & Dohme)  
0,6 mg Mucin aus Schweinemagen (Wilson)  
0,5 mg Blutgruppensubstanz aus Meconium  
4–10 mg Polysaccharide aus Pneumococcen der Typen IV, V, VI, VIII, XVIII, XIX.

Tabelle 9. N-haltige Polysaccharide mit *L. Bifidus*-Wirksamkeit

$\alpha$ -Heparin	Polysaccharide aus Pneumococcen
$\beta$ -Heparin	der Typen I, II, III, XIV.
Ovomucin	
Ovomucoid	
Hyaluronsäure	
Chondroitinsulfat	
Mucopolysaccharid aus Harn	

Tabelle 10. N-haltige Polysaccharide, die keine oder fast keine *L. Bifidus*-Wirksamkeit zeigen

<sup>35)</sup> Bull. soc. chim. biol. 15, 320 [1931]; Compt. rend. Soc. Biol. 104, 553, 555, 557 [1930]; Compt. rend. hebdo. Acad. Sci. 192, 1319 [1931].

Hohe *Bifidus*-Wirksamkeit ist allen bisher untersuchten Präparaten der Blutgruppensubstanzen A und B eigen. Bei diesen handelt es sich um Polysaccharid-Eiweißverbindungen vom Mol.-Gew. 260000, die nicht dialysieren und aus wäßriger Lösung durch Alkohol-Konzentrationen zwischen 50 und 60% quantitativ gefällt werden. Im Gegensatz dazu sind die niedermolekularen, aus Frauenmilch gewonnenen Präparate des *Bifidus*-wuchsstoffes völlig frei von Blutgruppenaktivität. Sie sind frei von Eiweiß, überhaupt von Aminosäure-Resten, sie dialysieren durch Cellophane und werden erst durch Alkohol bei Konzentrationen von über 80% gefällt.

Die Untersuchungen des Lister Instituts in London (W. T. J. Morgan) haben zu der Vorstellung geführt, daß in den Blutgruppensubstanzen der eiweißfreie Teil aus „repeating units“, sich wiederholenden Einheiten, bestehe, die aus N-Acetyl-hexosamin, L-Fucose und D-Galactose aufgebaut sind<sup>36)</sup>. Es sind dies dieselben chemischen Bausteine, wie beim *Bifidus*-Faktor der Frauenmilch.

Eigenschaften	Blutgruppensubstanzen	Präparate aus Frauenmilch
Blutgruppen-Wirksamkeit .....	+	—
<i>L. Bifidus</i> -Wirksamkeit .....	+	+
Eiweiß (Aminosäuren) .....	+	—
Dialyse durch Cellophan .....	—	+
Fällung durch Alkohol (50-60%)	+	—
Inaktivierung d. 212 A-Ferment	+	+

Tabelle 11

Vergleich von Blutgruppensubstanzen mit den niedermolekularen *Bifidus*-wirksamen Präparaten aus Frauenmilch

Merkwürdigerweise können aus der Penn-Mutante Enzymlösungen gewonnen werden, die den *Bifidus*-Faktor unter Abspaltung von N-Acetylglucosamin inaktivieren. Enzymlösungen aus normalen *Bifidus*-Zellen besitzen diese Eigenschaft nicht (Tabelle 12).

	1 Einheit in
Frauenmilch .....	0,10 cm <sup>3</sup>
Frauenmilch + <i>L. Bifidus</i> Penn-Enzym .....	1,00 cm <sup>3</sup>
Frauenmilch + <i>L. Bifidus</i> Penn-Enzym (gekocht)	0,095 cm <sup>3</sup>
Meconium (1%) .....	0,43 cm <sup>3</sup>
Meconium + <i>L. Bifidus</i> Penn-Enzym .....	inaktiv
Meconium + <i>L. Bifidus</i> Penn-Enzym (gekocht)	0,52 cm <sup>3</sup>
Meconium (1%) .....	0,43 cm <sup>3</sup>
Meconium + „Enzym“ aus Normal <i>L. Bifidus</i>	0,43 cm <sup>3</sup>

Tabelle 12  
Enzymatische Inaktivierung des *L. Bifidus*-Wuchsstoffes

Bei der Einwirkung des Enzyms auf Meconium sowie auf hochgereinigte Blutgruppensubstanzen gehen der Verlust von Blutgruppenaktivität und von *Bifidus*-Wirksamkeit Hand in Hand (G. Springer).

Eindrucksvoll ist der Reichtum an *Bifidus*-wuchsstoff, den jede Mutter ihrem Kinde spendet. Nicht minder aber auch die Tatsache, daß die Versorgung auf zwei ganz verschiedenen Wegen verläuft. Schon vor der Geburt wird im Darm des Kindes in erstaunlichen Mengen die hochmolekulare, blutgruppenaktive Form des Wuchsstoffes im Meconium angereichert, das den idealsten Nährboden für die *Bifidus*-Zellen darstellt, den wir kennen. Nach der

<sup>36)</sup> D. Aminoff, W. T. J. Morgan u. W. M. Watkins, Biochem. Journ. 46, 426 [1950] und weitere Veröffentlichungen im Biochem. Journ. In Präparaten, die aus Harn und aus Sperma gewonnen waren, sind N-Acetyl-D-glucosamin und D-Galactose erstmals von K. Freudenberg nachgewiesen worden. K. Freudenberg u. H. Eichel, Liebigs Ann. Chem. 510, 240 [1934]; 518, 97 [1935]; K. Freudenberg u. O. Westphal, Sitzungsber. Heidelb. Akad. Wiss. 1938, 1. Abh.; K. Freudenberg u. H. Molter, daselbst 1939, 9. Abh.; K. Freudenberg, H. Molter u. H. Walch, daselbst 1940, 9. Abh.; K. Freudenberg, Umschau 46, 373 [1942]; K. Freudenberg, H. Walch u. H. Molter, Naturwiss. 30, 87 [1942].

Geburt sind es das Colostrum und später die Milch, mit denen in niedriger molekularer Form weitere Wuchsstoffmengen dem Säugling zugeführt werden.

Die Frage, wie es zur Ansiedlung der *Bifidus*-Zellen im Darm des Neugeborenen kommt – das Meconium ist ja zunächst steril – läßt sich weitgehend, wenn auch noch nicht restlos, beantworten. Bei werdenden Müttern, die in den letzten Tagen vor der Geburt mit der eingangs geschilderten Technik daraufhin untersucht wurden, hat sich in mehr als 90% die Anwesenheit von *L. Bifidus* in der Vagina nachweisen lassen. Man nimmt deshalb an, daß die Infektion des Meconiums während des Geburtsaktes aus der Vagina heraus eintritt. Bei Kindern, die durch Kaiserschnitt entbunden werden, vermutet man, daß perorale Infektionen im Spiel sind.

Die Tatsache, daß N-Acetylglucosamin eine, wenn auch nur geringe Aktivität zeigt, hat Anlaß gegeben zu prüfen, ob diese Substanz von einer stillenden Mutter zum Aufbau von *Bifidus*-Wuchsstoff verwendet werden kann, d. h. ob nach peroraler Zufuhr von Acetylglucosamin die *Bifidus*-Wirksamkeit der Milch ansteigt. Für den Versuch stellte sich eine Mutter zur Verfügung, die bereits 12 Monate stillte. Die Aktivität ihrer Milch war zwischen dem 2. und 12. Monat wiederholt bestimmt worden und im Laufe dieser Zeit auf  $\frac{1}{4}$  abgefallen. Sie erhielt an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen 3 mal täglich je 0,5 g reines N-Acetylglucosamin. Da dieses angenehm süß schmeckt, wäre gerne mehr genommen worden. Die Aktivität der Milch in diesen und den darauffolgenden Tagen ist unverändert niedrig geblieben.

Meinen Dank habe ich auszusprechen Herrn Prof. Dr. Paul György, der in alter, aus der Lactoflavin-Zeit stammender Verbundenheit mich eingeladen hat, chemisch am *Bifidus*-Faktor mitzuarbeiten, zugleich aber auch der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften sowie der University of Pennsylvania, die mir dies ermöglicht haben. Die vielen Hektoliter von Frauenmilch, die in Heidelberg von Fr. Dr. A. Gauhe auf *Bifidus*-Faktor verarbeitet worden sind, stammen aus allen Teilen der westdeutschen Bundesrepublik. In der Unterstützung, die uns zuteil wurde, sind Ärzte und Schwestern wiederholt an die Grenzen dessen gegangen, was mit der Betreuung der Kleinsten vereinbar schien. Besonders hilfreich, auch in bezug auf die Beschaffung von Colostrum, Meconium, Fruchtwasser u. a. ist Herr Prof. Dr. H. Runge, der Direktor der Heidelberger Frauenklinik, gewesen. Ferner Herr Prof. Dr. Peter Dahr, der Direktor des Instituts für Blutgruppenforschung an der Universität Göttingen, dem wir die serologischen Prüfungen verdanken und nicht zuletzt Herr Prof. Dr. A. Butenandt, der durch Ultrarotaufnahmen uns bedeutsame Hilfe in Konstitutionsfragen zuteil werden ließ.

### Zusammenhänge und Ausblick

Die biochemischen Aspekte einiger Fragen, die von altersher mit Muttermilch und Menschentränen zusammenhängen und die uns hier beschäftigt haben, wären unvollständig, wenn ich Ihre Aufmerksamkeit nicht noch auf folgende Punkte lenken würde:

1) Es fällt auf, daß die Verteilung des *Bifidus*-Faktors im Menschen eine gewisse Ähnlichkeit erkennen läßt mit der Reihenfolge der Häufigkeit, in der die einzelnen Organe von Carcinomen befallen werden. Die Brustdrüse der

Frau, der Magen und die Sexualorgane stehen in beiden Fällen an der Spitze<sup>37)</sup>. So erhebt sich die Frage, ob bei Entwicklung bösartiger Tumoren in diesen Organen diejenigen N-haltigen Saccharide, zu denen der *Bifidus*-Wuchsstoff gehört, unverändert und unbeteiligt bleiben werden.

2) Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß manche N-haltige Polysaccharide einen gewissen Schutz, nämlich eine verzögerte Wirkung („delaying effect“) auf das Angehen von Virusinfektionen auszuüben vermögen. Es handelt sich um Befunde bei Mumpsvirus, Influenzavirus, Pneumonievirus, Polyomyelitisvirus, dem Erreger der Kinderlähmung, u. a., die von F. L. Horsfall und Maclyn McCarthy<sup>38)</sup>, von H. S. Guisberg, W. F. Goebel und F. L. Horsfall<sup>39)</sup>, von F. M. Burnet<sup>40)</sup>, H. M. Rose<sup>41)</sup> und anderen erhoben worden sind. A. B. Sabin<sup>42)</sup> an der University of Cincinnati hat in Tierversuchen gefunden, daß Frauenmilch viel stärker als Kuhmilch Polyomyelitis-Viren abzuschwächen vermag. Angesichts dieser Erkenntnisse ist es nicht ausgeschlossen, daß das von uns festgestellte Vorkommen verhältnismäßig großer Mengen von N-haltigen Polysacchariden und Oligosacchariden in der Frauenmilch, die man in der Kuhmilch nicht oder nur in sehr viel kleineren Mengen antrifft, dazu beitragen kann, etwas dem Verständnis näher zu bringen, was die Kinderärzte seit langem beschäftigt: Die höhere Resistenz des Brustkindes im Vergleich zum Flaschenkind. Es wird vielfach angenommen, daß diese höhere Resistenz sich nicht nur auf Erkrankungen des Verdauungstraktes, sondern auch der Atmungsorgane bezieht.

Bisher sind durch A. B. Sabin<sup>43)</sup> in der Frauenmilch vier Antivirusstoffe in geringen Mengen nachgewiesen worden, deren Wirkung sich gegen Polyomyelitis, Mumps und zwei verschiedene Stämme von Encephalitis richtet. Nur einer von diesen vier Faktoren ließ sich auch in der Kuhmilch feststellen. Eine Reindarstellung dieser Schutzstoffe, d. h. eine genaue physikalische und chemische Charakterisierung, ist aber noch nicht erzielt. Man kann kaum mehr sagen, als daß die Chemie der Milch auch heute noch eine bedeutende Zahl von ungelösten Fragen in sich schließt.

Mit dem Bericht über den von P. György in der Frauenmilch entdeckten *Bifidus*-Faktor haben wir die Grenzen der Lehre von den eigentlichen Vitaminen möglicherweise überschritten und mit den letzten Ausführungen haben wir uns von diesem Gebiete noch weiter entfernt. Die Erfahrung von Jahrtausenden, im Laufe derer immer wieder Menschenkinder nicht mit Muttermilch, sondern mit Kuhmilch aufgezogen worden sind, scheint der Annahme zu widersprechen, daß es sich beim *Bifidus*-wuchsstoff um einen im klassischen Sinne absolut lebenswichtigen Bestandteil der Säuglingsnahrung handelt – es sei denn, daß die 2–3%, die man in der Kuhmilch findet, sich als nahezu ausreichend erweisen werden. Die Frage der Nomenklatur, wie sie an Grenzgebieten der Erkenntnis stets auftaucht, soll vorerst offen bleiben. Vielleicht wird man auf den ursprünglichen Begriff der akzessorischen Nährstoffe zurückkommen, vielleicht wird man die Definition der Vitamine erweitern.

<sup>37)</sup> Erst in jüngster Zeit scheint die Häufigkeit von Carcinomen der Lunge diejenige dieser Organe in manchen Gegenden zu überfliegen. Die Gründe hierfür sind noch nicht geklärt. Nach K. H. Bauer: Das Krebs-Problem, Springer-Verlag 1949, S. 33ff., Abb. 13 auf S. 38, wurden der Verdauungstrakt mit 50%, die Geschlechtsorgane mit 27% und die Atemwege mit nur 8% befallen.

<sup>38)</sup> Journ. exper. Medic. 85, 623 [1947].

<sup>39)</sup> Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 66, 99 [1947].

<sup>40)</sup> Austr. Journ. Exper. Biol. 27, 361 [1949].

<sup>41)</sup> Feder. Proc. 11, I, 479 [1952].

<sup>42)</sup> Amer. Journ. Publ. Health 41, 1215 [1951].

<sup>43)</sup> Vortrag auf dem Symposium der Society of American Bacteriologists im Edgewater Beach Hotel, Chicago, Ill., am 28. Mai 1951.

Die Geschichte des Carotins, des Lactoflavins und des *Bifidus*-Faktors spiegelt Entwicklungen der experimentellen Methoden auf dem Gebiete der Vitaminforschung wider. Vor 25 Jahren gab es nur den Test am lebenden Tier. Für Carotine und Carotinoide ist dieser Test bis heute im wesentlichen der einzige geblieben. Man brauchte Versuchstiere und hochgereinigte Nahrungsmittel, die von dem zu bestimmenden Vitamin praktisch frei waren. Auch die Isolierung des Lactoflavins war noch ganz an einen solchen Tiertest gebunden, der 3–4 Wochen erforderte. Es zeigte sich aber bald, daß man dieses Vitamin genauer und sehr viel schneller bestimmen kann, wenn man seine Wuchsstoffwirkung für geeignete Mikroorganismen mißt. Damit haben Methoden der Bakteriologie und Mikrobiologie das Gesicht der Laboratorien gewandelt und weite Verbreitung als Hilfsmittel der Vitaminforschung gefunden. Methoden der Genetik kamen hinzu. Die geschilderten Untersuchungen über Frauenmilch

haben von der Isolierung einer Mutante ihren Ausgang genommen. Zum bakteriologischen Test sind hier die laboratoriumstechnischen Verfahren der Serologie und Immunologie hinzugekommen und Wünsche nach Versuchen mit keimfreien Versuchstieren, die vorerst noch außerordentlich kostspielig sind, wach geworden. Die gleichzeitige Beherrschung all dieser Methoden kann für den weiteren Fortschritt bestimmt werden.

Untersuchungen über Kuhmilch, aus der das Lactoflavin isoliert wurde, haben vor 20 Jahren zwei Gebiete der Forschung, die bis dahin völlig getrennt waren, miteinander verbunden: Das Gebiet der Vitamine und dasjenige der Fermente.

Aus der Beschäftigung mit der Frauenmilch erlebt jetzt eine weitere Brücke. Diese führt von den Wuchsstoffen der Mikroorganismen zu den blutgruppenspezifischen Substanzen unseres Körpers und damit in das große Gebiet der Immunchemie.

Eingeg. am 8. Juli 1952 [A 444]

## Konstitutionsermittlung von Sulfato-Chrom-(III)-Komplexen mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen

Von Dr.-Ing. HANS ERDMANN, Darmstadt\*

Aus dem Institut für Gerbereichemie an der Technischen Hochschule Darmstadt

Chromsulfat-Lösungen verschiedener thermischer Vorbehandlung und Alterung wurden konduktometrisch mit Natronlauge titriert. Das erhaltene Kurvenmaterial wurde im Hinblick auf die Konstitution der vorliegenden Chromkomplex-Typen ausgewertet.

Leitfähigkeitsmessungen an Lösungen anorganischer Komplexverbindungen mit dem Ziel einer Konstitutionsaufklärung unternahm erstmalig A. Werner<sup>1)</sup>. Aus der Größe der absoluten Leitfähigkeit äquimolarer Lösungen konnte er Aussagen über die Ladungszahl (Wertigkeit) der Komplexe machen. Eine Voraussetzung sind einheitliche und wohldefinierte Komplexverbindungen in Form gut ausgebildeter Kristalle. Hier soll gezeigt werden, daß auch Komplexverbindungen, die nur in Lösung existenzfähig sind, und zwar zusammen mit anderen Komplexverbindungen, zwischen denen Gleichgewichts- und Umwandlungsbeziehungen bestehen, untersucht werden können.

Diese Situation ist bei den wässrigen Lösungen von Chrom(III)-Salzen gegeben, in denen durch Hydrolyse ein Zerfall in basische Salze und freie Säuren auftritt. Bei Chromsulfat-Lösungen kommt als weitere Komplikation die Gegenwart des komplexaktiven Sulfat-Ions hinzu, das abhängig von Temperatur und Konzentration mehr oder weniger weitgehend in die basischen Chrom-Komplexe eintreten kann. Die Bildung von Sulfato-Komplexen zeigt sich z. B. darin, daß kalt hergestellte Hexaquochromsulfat-Lösungen beim Erhitzen einen Farbwechsel von Violett nach Grün zeigen und – im Gegensatz zu gleichartig behandeltem Chromchlorid- oder Chromnitrat-Lösungen – die Farbe beim Abkühlen beibehalten.

Es hat bereits in der älteren Literatur nicht an Bemühungen gefehlt, die Zusammensetzung der in Chromsulfat-Lösungen vorliegenden Chrom-Komplexe aus analytischen und chemisch-physikalischen Messungen näher zu charakterisieren (*Recoura*<sup>2)</sup>, *Whitney*<sup>3)</sup>,

*Colson*<sup>4)</sup>, *Denham*<sup>5)</sup>, *Siewert*<sup>6)</sup>, *Graham*<sup>7)</sup>, *Richardts* und *Bonne*<sup>8)</sup>, *Bjerrum*<sup>9)</sup>). Aber erst durch die grundlegenden Untersuchungen von E. Stiasny<sup>10)</sup> über die Hydrolyse und Aggregation (Verolung) von basischen Chromsalzen wurde eine theoretische Grundlage geschaffen, welche die wesentlichen Merkmale (Mehrkerigkeit, Vernetzung über OH-Brücken, Einbau von komplex gebundenen Sulfatresten) der Chrom-Komplexe in Chromsulfat-Lösungen durch Formeln in der Wernerschen Schreibweise schematisch wiedergibt. Diese experimentellen Unterlagen reichten jedoch nicht aus, um ein eindeutiges Bild der Konfiguration der tatsächlich existierenden Chromkomplex-Typen und der in Chromsulfat-Lösungen vorliegenden Gleichgewichtsverhältnisse zu geben. Das gilt auch für weitere Untersuchungen mit Hilfe physikalischer Methoden, wie potentiometrische und konduktometrische Titration (*Theis*<sup>11,12)</sup>, *S.G. Shuttleworth*<sup>13)</sup>). Bestimmung der Diffusions- und Dialysengeschwindigkeit (*Riess* und *Barth*<sup>14)</sup>) und die Messung der Lichtabsorption (*Theis*<sup>15)</sup>).

Während die aus den zuletzt genannten Untersuchungen entwickelten Formelbilder mehr oder weniger deutlich an die Stiasnyschen Verolungsformeln anknüpfen, für die der Aufbau mehrkerniger Chromsalze über je zwei OH-Brücken zwischen je zwei benachbarten Chrom-Atomen cha-

- <sup>3)</sup> W. R. Whitney, Z. physik. Chem. 20, 40 [1896].
- <sup>4)</sup> A. Colson, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 140, 42, 1451 [1905]; 141, 119 [1905]; 145, 250 [1907]; Ann. Chim. Phys. (8) 12, 464 [1907].
- <sup>5)</sup> H. G. Denham, Z. physik. Chem. 57, 361 [1909].
- <sup>6)</sup> R. Siewert, Ann. Chem. Pharmaz. 125, 86 [1862].
- <sup>7)</sup> Th. Graham, Liebigs Ann. Chem. 121, 1 [1862].
- <sup>8)</sup> Th. W. Richards u. I. Bonnet, Z. physik. Chem. 47, 29 [1904].
- <sup>9)</sup> N. Bjerrum, Z. physik. Chem. 59, 336, 581 [1907]; Z. anorg. Chem. 119, 192 [1921].
- <sup>10)</sup> E. Stiasny: Gerbereichemie, Dresden u. Leipzig 1931.
- <sup>11)</sup> E. R. Theis, A. W. Goetz u. R. G. Snyder, J. Amer. Leather Chemists Assoc. 28, 260 [1933].
- <sup>12)</sup> E. R. Theis u. E. J. Serfass, J. Amer. Leather Chemists Assoc. 29, 543 [1934]; 30, 341 [1935].
- <sup>13)</sup> S. G. Shuttleworth, J. int. Soc. Leather Trades Chemists 23, 324 [1939]; 24, 115, 166 [1940]; 27, 104, 111 [1943]; 30, 264 [1946]; 31, 334 [1947]; 33, 92 [1949]; 34, 186 [1950]; ref. in Fortschrittsber. in „Das Leder“ I, 162, 185, 228, 239, 291 [1950] (dort ausführliche Literaturzusammenstellung).
- <sup>14)</sup> C. Riess u. K. Barth, Collegium [Darmstadt], 1935, 62.
- <sup>15)</sup> E. J. Serfass, C. D. Wilson u. E. R. Theis, J. Amer. Leather Chemists Assoc. 44, 647 [1949].

\*) Habilitationsschrift Technische Hochschule Darmstadt.

<sup>1)</sup> A. Werner u. P. Pfeiffer: Neuere Anschauungen auf dem Gebiet d. anorg. Chemie, Braunschweig [1923].

<sup>2)</sup> A. Recoura, Ann. Chim. Phys. (7) 4, 494 [1895]; C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 169, 1163 [1919]; 170, 1494 [1920].