

286. Hermann Fink, Felix Just und Andreas Hock: Über die Biosynthese von Vitamin B₁ und Cocarboxylase durch Mikroorganismen*).

[Aus d. Institut für Gärungsgewerbe u. Stärkefabrikation d. Universität Berlin.]
(Eingegangen am 3. Januar 1943.)

Die Wirkungen des Vitamins B₁ und der beiden sein Molekül aufbauenden Komponenten auf niedere Organismen sind vielfach studiert worden. Während man dabei meist den Einfluß auf Wachstum oder Stoffwechsel untersuchte, ist die Frage, ob durch Mikroorganismen das Aneurinmolekül aus dem Thiazol- und Pyrimidin-Spaltstück aufgebaut werden kann, bisher in keinem Falle unmittelbar bewiesen worden.

So wächst der Pilz *Phycomyces blakesleanus* auch bei gleichzeitigem Angebot der Thiazol- und Pyrimidin-Komponente ebenso gut wie bei Zusatz äquivalenter Mengen von Aneurin. Der Nachweis von biosynthetischem Vitamin B₁ fiel aber sowohl im Rattentest als auch mittels Thiochromreaktion negativ aus¹⁾. Dagegen ist der Vollzug dieser Synthese durch den tierischen Organismus nicht mehr zweifelhaft^{2) 3) 4) 5)}, worauf später nochmals eingegangen wird.

Als wir diese Frage im Rahmen unserer Versuche über den Vitamin-B₁-Gehalt verschiedener Hefen und seine Beeinflussung^{6) 7) 8) 9) 10)} bearbeiteten, fanden wir vor kurzem^{11) 12)} die sehr glatt verlaufende Biosynthese, genauer gesagt, Teilbiosynthese, des Vitamins B₁ bzw. seines Pyrophosphats, der Cocarboxylase, mittels verschiedener Gärungserreger. Gibt man nämlich die Thiazol-Komponente 4-Methyl-5-oxäthyl-thiazol und die Pyrimidin-Komponente 2-Methyl-4-amino-5-oxymethyl-pyrimidin in äquivalenter Menge zu gärender Torulahefe, so entsteht, wenn man bestimmte Bedingungen beachtet, in fast 100-proz. Ausbeute Vitamin B₁ (Aneurin). Dieses findet sich im allgemeinen aber nicht in der umgebenden Kulturflüssigkeit, sondern wird fast restlos von der Hefe aufgenommen und zum größten Teil an Phosphorsäure gebunden als Cocarboxylase in die Zelle eingebaut. Außer der Verknüpfung der Teilstücke erfolgt also auch noch die Speicherung und Phosphorylierung auf mikrobiologischem Wege. Man kann auf diese Weise Hefen mit gewaltig gesteigertem Vitamin-B₁-Gehalt von 1000 γ in 1 g Trockensubstanz und mehr erzielen. Solche Hefen haben gegenüber den üblichen aus Holzzucker oder Sulfitablaugen industriell gewonnenen Torulahefen mit ihrem meist ziemlich gleichliegendem,

*) Zugleich VIII. Mitteil.: „Über den Vitamin-B₁-Gehalt verschiedener Hefen und seine Beeinflussung“. VII. Mitteil.: H. Fink u. F. Just, *Biochem. Ztschr.* **313**, 39 [1942].

¹⁾ W. H. Schopfer, *Arch. Mikrobiol.* **9**, 116 [1938].

²⁾ W. J. Robbins u. Mitarb., *Proceed. nat. Acad. Sci. USA.* **23**, 388 [1937]; vergl. auch Sh. Morii, *Biochem. Ztschr.* **309**, 359 [1941].

³⁾ E. u. R. Abderhalden, *Arch. Physiol.* **240**, 746 [1938].

⁴⁾ R. Abderhalden, *Med. Klin.* **1940**, 1213.

⁵⁾ E. u. R. Abderhalden, *Arch. Physiol.* **242**, 508 [1939]; **243**, 85 [1939].

⁶⁾ H. Fink u. F. Just, *Biochem. Ztschr.* **308**, 15 [1941].

⁷⁾ H. Fink, F. Just, A. Scheunert u. K. H. Wagner, *Biochem. Ztschr.* **309**, 1 [1941].

⁸⁾ H. Fink u. F. Just, *Biochem. Ztschr.* **309**, 212 [1941].

⁹⁾ H. Fink u. F. Just, *Biochem. Ztschr.* **309**, 219 [1941].

¹⁰⁾ H. Fink u. F. Just, *Biochem. Ztschr.* **311**, 61 [1942].

¹¹⁾ H. Fink u. F. Just, *Biochem. Ztschr.* **311**, 287 [1942].

¹²⁾ H. Fink u. F. Just, *Biochem. Ztschr.* **313**, 39 [1942].

relativ niedrigem Vitamin-B₁-Gehalt von etwa 20 γ in 1 g Trockensubstanz einen bis zu 60-mal höheren Vitamin-B₁-Gehalt. Sie übertreffen in dieser Eigenschaft aber auch die bisher Vitamin-B₁-reichsten Mikroorganismen, die untergärigen Bierhefen mit 200—300 γ Vitamin B₁ in 1 g Trockensubstanz um ein Mehrfaches.

Bietet man der Hefe nur eine der beiden Komponenten des Aneurinmoleküls an, so tritt bei Zusatz des Thiazols nur eine ganz geringe Erhöhung, bei Zusatz des Pyrimidins überhaupt keine Steigerung des Aneurinergehalts ein.

Zu dieser Biosynthese des Vitamins B₁ bzw. der Cocarboxylase erwiesen sich nach unseren bisherigen Feststellungen in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße befähigt:

- 1) *Torula utilis* (*Torulopsis utilis*)¹³), 2) obergärige Brenneriehefe¹⁴),
- 3) *Oidium lactis* (*Oospora lactis*)¹⁵), 4) *Endomyces vernalis* (Ludwig)¹⁶),
- 5) *Aspergillus oryzae*¹⁷), 6) Obergärige Bierhefe¹⁸).

Nicht befähigt war dagegen die untergärige Bierhefe unserer Berliner Hochschül-Brauerei. Verschieden ist von Organismus zu Organismus das Verhältnis von freiem zu gebundenem (Cocarboxylase) Aneurin in der Zelle. Während bei *Torula utilis* über 90% gebunden vorliegen, fanden wir in einem Versuch bei der obergärigen Brenneriehefe Rasse M nur 16%. Hier sind aber noch weitere Versuche notwendig.

Reizvoll war es nun zu prüfen, ob bei unserer Biosynthese nur jene Thiazol- und besonders Pyrimidin-Verbindungen zum vollständigen Aneurinmolekül zusammengebaut werden, die als unmittelbare Vorstufen bei der Aneurinsynthese nach H. Andersag und K. Westphal¹⁹) dienen, oder ob auch weiterzurückliegende Vorstufen dieser rein chemischen Synthese genügen. Letzteres war hier der Fall und wurde von uns für den Pyrimidinanteil gezeigt, der ja im Gegensatz zum Thiazolanteil eine größere Zahl von chemischen Reaktionsfolgen durchläuft. Während folgende 4 anderen Pyrimidinderivate²⁰):

- I) 2-Methyl-4-oxy-pyrimidyl-(5)-essigester,
- II) 2-Methyl-4-chlor-pyrimidyl-(5)-essigester,
- III) 2-Methyl-4-amino-pyrimidyl-(5)-acetamid,
- IV) 2-Methyl-4-amino-5-nitrilo-pyrimidin,

¹³) Die heute im In- und Ausland zur industriellen Hefegewinnung aus Holzzucker, Sulfitaablaugen, Melasse, Strohhydrolysaten usw. benutzte *Torula utilis*, die im Weltkrieg am Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation von Henneberg gefunden und von Delbrück erstmals zur Futterhefengewinnung aus Melasse angewandt worden ist, hat neuerdings durch das Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Holland), zusätzlich den Namen *Torulopsis utilis* (Henneberg) Lodder erhalten.

¹⁴) Mischrasse M des Instituts für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation, bestehend aus 4 verschiedenen, reingezüchteten, obergärigen Brenneriehefenrassen.

¹⁵) Stamm A, 1937 von H. Fink und Mitarbeitern aus etwa 50 Stämmen von *Oospora lactis* als bester Fettbildner erkannt, Wschr. Brauerei 1937, 89.

¹⁶) Von P. Lindner an diesem Institut im Weltkrieg als „Fettheife“ erkannt.

¹⁷) Stamm aus unserer Mikroorganismen-Sammlung.

¹⁸) Hochschulbrauerei Berlin.

¹⁹) B. 70, 2035 [1937].

²⁰) Wir danken auch an dieser Stelle Hrn. Direktor Professor Dr. Hörlein von der I. G. Farbenindustrie A. G., Werk Elberfeld, bestens für die freundliche Überlassung dieser Präparate.

teils keinen, teils nur ganz unbedeutenden Effekt gaben, wurden das 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin ebenso gut wie die unmittelbare Vorstufe, das 2-Methyl-4-amino-5-oxymethyl-pyrimidin, verwertet, mit Thiazol gekoppelt und phosphoryliert. Somit können durch diese mikrobiologische Synthese die vier letzten Reaktionsfolgen der rein chemischen Synthese eingespart werden, nämlich der Ersatz der aliphatischen Aminogruppe durch Hydroxyl, der Ersatz der Hydroxylgruppe durch Brom, die Kopplung mit dem Thiazol und endlich die Phosphorylierung des Aneurins zur zelleigenen Cocarboxylase.

Im Gegensatz zur Synthese vieler Naturstoffe, bei denen die Natur ganz andere, für uns noch undurchsichtige Wege einschlägt, liegt hier ein Fall vor, wo Pflanzenzelle und Chemiker anscheinend weitgehend analog arbeiten. Auch bei Zusatz von 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin verläuft die Biosynthese bei Einhaltung spezieller Bedingungen mit nahezu theoretischer Ausbeute, worauf nochmals zurückzukommen sein wird. Die Überlegenheit der lebenden Zelle, die das synthetische Ziel auf elegantere und rationellere Weise erreicht, gegenüber der rein chemischen Synthese, bei der ja die einzelnen notwendigen chemischen Reaktionsphasen naturgemäß mit Ausbeuteverlusten verknüpft sind, tritt gerade in diesem letzteren Falle besonders deutlich in den Vordergrund.

Wichtig war nun noch folgende Beobachtung:

Die Verknüpfung der Spaltstücke zum kompletten Molekül des Vitamins B₁ verläuft nur dann verlustfrei und mit einer Ausbeute von fast 100%, wenn man mit gärender oder mit „selbstgärender“ Hefe im „Erschöpfungsversuch“ arbeitet. Bei der Zugabe unter den Bedingungen des optimalen Hefewachstums, wie es bei dem intensiv belüfteten Ansatz mit Nährstoffzulauf eintritt, fehlen im Bilanzversuch rund 30% des zu erwartenden Vitamins B₁. Dieser Anteil wird wahrscheinlich bei den äußerst intensiven Atmungsvorgängen mit verbrannt. Aber selbst diese mit nur 70% Ausbeute verlaufende Biosynthese bei der üblichen Hefezüchtung wäre noch der rein chemischen Synthese mit ihren nicht zu vermeidenden Verlusten an kostbarem Material überlegen.

Das, was eben über den Einfluß der anaeroben bzw. aeroben Gärführung auf den Wirkungsgrad gesagt wurde, trifft vollinhaltlich auch für die Biosynthese zwischen Thiazol und dem früheren Vorprodukt der chemischen Synthese, dem 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin, zu. Auch hier treten im intensiv belüfteten Ansatz, also unter maximal aeroben Bedingungen, Verluste an Aneurin in Höhe von etwa 30% auf, während im Gäransatz mit zugesetzter Glucose oder auch bei Selbstgärung fast theoretische Ausnutzung beobachtet werden konnte.

In bezug auf die Ausbeute an Aneurin aus den Teilstücken dürfte die von uns beobachtete Biosynthese durch Gärungsorganismen der schon früher von W. J. Robbins²⁾ und besonders von E. und R. Abderhalden^{3) 5)} gefundenen biochemischen bzw. enzymatischen Synthese²¹⁾ überlegen sein, denn die Heilungen der an Polyneuritis erkrankten Versuchstiere durch entsprechende Thiazol- bzw. Pyrimidin-Verbindungen wurden durch gewaltige bis zu 1000-

²¹⁾ Ausführlichere Würdigung dieser Arbeiten siehe H. Fink u. F. Just, *Biochem. Ztschr.* **311**, 287 [1942].

fache Überdosierungen (bezogen auf äquivalente Mengen Aneurin) erreicht. Und bei der interessanten Synthese durch Organextrakte von E. und R. Abderhalden betrug die Ausbeute nur 1—1.5% der Theorie. Wir halten es aber für möglich, daß sich durch andere Versuchsbedingungen auch beim Tier die Wirkung erhöhen läßt.

Aber auch beim Vergleich mit ähnlichen mikrobiologischen Synthesen fällt die hohe, fast theoretische Ausbeute ins Auge. So wurden bei der unlängst von Th. Wieland und E. F. Möller²²⁾ gefundenen biologischen Synthese der Pantothensäure aus den Komponenten β -Alanin und (—)- α -Oxy- β , β -dimethyl- γ -butyrolakton mittels besonders vorbehandelter Hefe Rasse M von diesen Autoren normalerweise etwa 0.3%, nach Aktivierung durch NH_4 -Ionen maximal 3% der theoretisch möglichen Pantothensäuremenge gefunden. Es scheinen bei der von uns beobachteten Biosynthese des Aneurins bzw. der Cocarboxylase besonders günstige Gleichgewichtszustände bei einzelnen Teilreaktionen zu herrschen, wobei sowohl die Bindung des Aneurins an Pyrophosphorsäure wie die Bindung der Cocarboxylase bzw. des Aneurins an andere Biokatalysatoren in der Zelle eine Rolle spielen dürften.

Auf die theoretische und praktische Bedeutung der biosynthetischen Gewinnung von Aneurin und auf die Bedeutung der neuen Hefen mit bis fast aufs 100-fache zu steigendem Gehalt an Vitamin B_1 bzw. Cocarboxylase wird nochmals später an anderer Stelle eingegangen werden.

Aufgabe der vorliegenden Experimentalarbeit war nun folgende: Bei unseren Versuchen hatten wir zur Bestimmung des freien sowie des aus Cocarboxylase freigelegten Aneurins fast ausschließlich die Thiochrommethode angewandt, wobei die von Ritsert angegebene Modifikation von dem einen von uns (F. Just) speziell für unseren Zweck etwas abgewandelt worden war. Es war nun aber der Einwand nicht von der Hand zu weisen, daß bei der Biosynthese nicht biologisch wirksames Aneurin entstehe, sondern ein biologisch unwirksames Isomeres, das aber dasselbe der quantitativen Bestimmungsmethode zugrunde liegende Fluoreszenzverhalten zeigen könne. Es war deshalb notwendig, die B_1 -Wirksamkeit bzw. die Cocarboxylase-Aktivität im biologischen Versuch zu überprüfen. Dies geschah für letztere schon in einer früheren Untersuchung, in der H. Fink und F. Just¹¹⁾ die Cocarboxylase-Aktivität der mit biosynthetischem Aneurin angereicherten Hefen nach der Methode von Auhagen und Lohmann bestimmten. Diese entsprach den Thiochromwerten. Es hatte also eine Synthese von phosphoryliertem Aneurin aus den angebotenen Spaltstücken stattgefunden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun auch noch an wachsenden Ratten die Vitamin- B_1 -Wirkung von zwei *Torula-utilis*-Hefen durch A. Hock ausgetestet, die durch Darbietung von Thiazol und Pyrimidinen auf etwa 10-fachen Vitamin-gehalt gebracht worden waren. Das für diese Versuche verwendete Thiazolpräparat war dabei in beiden Fällen 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol, das Pyrimidinpräparat dagegen im ersten Falle 2-Methyl-4-amino-5-oxymethyl-pyrimidin („OH-Hefe“), im zweiten Falle 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidin („ NH_2 -Hefe“).

²²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **269**, 227 [1941]; **272**, 232 [1942]. Vergl. auch R. Kuhn u. Th. Wieland, B. **75**, 121 [1942].

Auch die Tierversuche brachten die Bestätigung, daß eine echte Synthese von Vitamin B₁ aus diesen Komponenten durch die Hefe erfolgt.

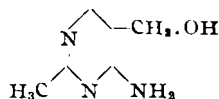
Beschreibung der Versuche.

Kontrolle der mikrobiologischen Aneurin-Synthese aus den Spaltstücken im Rattentest.

Die Anreicherung der Hefe (*Torula utilis*) erfolgte im Gäransatz auf bekannte Weise²³⁾. Dabei wurde ein Vitamin-B₁-Gehalt angestrebt, der gegenüber normaler *Torula utilis* etwa 11-fach, gegenüber normaler Bierhefe etwa gleich hoch sein sollte.

I) Präparat, genannt „OH-Mischung“, M 1.

Synthese aus 2-Methyl-4-amino-5-oxymethyl-pyrimidin und Thiazol: Die chemische Bestimmung nach der Thiochrommethode ergab 1 g Hefe-Trockensubstanz²⁴⁾ („OH-Hefe“) enthält 230 γ B₁^{23a)}.



Um in einen für den Tierversuch bequemeren Bereich zu kommen — von dieser auf das 11-fache angereicherten *Torula* hätten pro Tag und Ratte schon etwa 8 mg Tr.-Sbst. genügt — wurde aus der Hefe und vitamin-B₁-freier Stärke eine Mischung mit 10-mal kleinerem B₁-Gehalt auf folgende Weise hergestellt:

60 g abgepreßte „OH-Hefe“ (Tr.-Sbst.-Geh. 25.55%; B₁-Gehalt 230 γ/1 g Tr.-Sbst.) wurden unter Zugabe von etwas Aceton und unter kurzem Erwärmen verflüssigt. Das dünnflüssige Plasmolysat wurde sorgfältig auf 130 g B₁-freie Stärke (86.20% Tr.-Sbst.-Gehalt) verteilt, das Gemisch sodann im Va. bei 40° Höchsttemperatur getrocknet, gepulvert, in der Kugelmühle zerstäubt und durchgemischt, unter nochmaliger sorgfältiger Durchmischung quantitativ gesammelt und schließlich in der so gewonnenen Probe der B₁-Gehalt und der Trockensubstanzgehalt bestimmt.

| | | |
|---|---------|--|
| 60.0 g abgepreßte „OH-Hefe“ (25.55%) | = | 14.13 g Tr.-Sbst. mit 3250 γ B ₁ |
| ∴ 130.0 g B ₁ -freie Stärke (86.02%) | = | 112.06 g Tr.-Sbst. mit 0 γ B ₁ |
| Mischung „OH“ ber. | = | 126.2 g Tr.-Sbst. mit 3250 γ B ₁ |
| Mischung „OH“ gef. | = | 138.8 g Gemisch mit 90.90% Tr.-Sbst. |
| | | = 126.2 g Tr.-Sbst. |

In 14.13 g Hefe-Trockensubstanz (230 γ/1 g) waren also 3250 γ B₁ enthalten, somit treffen also auf 138.8 g lufttrocknes Gemisch (mit 90.90% Tr.-Sbst.-Geh.) ebenfalls 3250 γ, pro 1 g Gemisch demnach 23 γ B₁; bei der chemischen Bestimmung wurde in guter Übereinstimmung mit diesem berechneten Wert 22–24 γ/1 g Gemisch gefunden. Demnach hätte 1 g Gemisch 12.2–13.3, im Mittel also 12.7 Ratteneinheiten (1.8 γ B₁) enthalten bzw. die ausreichende Dosis hätte rund 80 mg Gemisch/Tag/Ratte betragen müssen. Da die Ausgangshefe (*Torula*) nur 20 γ/1 g Tr.-Sbst. enthielt, hätte der B₁-Gehalt bei fehlender Synthese bzw. Anreicherung in der Mischung nur den elften Teil, d. h. etwa 1 Ratteneinheit/1 g Gemisch betragen müssen.

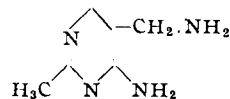
²³⁾ H. Fink u. F. Just, Biochem. Ztschr. **311**, 291, 301 [1942].

^{23a)} B₁ = Aneurinhydrochlorid.

²⁴⁾ Trockensubstanz wird im folgenden Tr.-Sbst. bezeichnet.

II) Präparat, genannt „NH₂-Mischung“, M 2.

Synthese aus 2-Methyl-4-amino-5-amino-methyl-pyrimidin und Thiazol: Die chemische Bestimmung nach der Thiochrommethode ergab bei dieser angereicherten „NH₂-Hefe“ einen B₁-Gehalt von 240 γ B₁ pro 1 g Trockensubstanz. Wie vorstehend beschrieben, wurden aus 60.0 g abgepreßter „NH₂-Hefe“ ein Gemisch mit B₁-freier Stärke hergestellt.



| | |
|---|--|
| 60.0 g abgepreßte „NH ₂ -Hefe“ (23.05 %) = | 13.83 g Tr.-Sbst. mit 3320 γ B ₁ |
| + 130.0 g B ₁ -freie Stärke (86.02 %) = | 112.06 g Tr.-Sbst. mit 0 γ B ₁ |
| Mischung „NH ₂ “ ber. = | 125.9 g Tr.-Sbst. mit 3320 γ B ₁ |
| Mischung „NH ₂ “ gef. = | 137.4 g Gemisch mit 91.63 % Tr.-Sbst. |
| | = 125.9 g Tr.-Sbst. |

Durch die 60.0 g abgepreßte, angereicherte „NH₂-Hefe“ mit 240 γ B₁/1 g Tr.-Sbst. wurden also 3320 γ B₁ in die Mischung (137.4 g) hineingebracht. Auf 1 g Gemisch (lufttrocken, 91.63 % Tr.-Sbst.-Geh.) entfallen also nach Berechnung 24 γ B₁; bei der chemischen Bestimmung nach der Thiochrommethode wurden in guter Übereinstimmung damit 21—23 γ, im Mittel also 22 γ/1 g Gemisch gefunden. Demnach enthielte also 1 g Gemisch im Mittel 12.2 Ratteneinheiten bzw. die ausreichende Dosis hätte ebenfalls wie bei dem „OH“-Präparat rund 80 mg/Tag/Ratte betragen müssen. Da die Ausgangshefe (*Torula*) nur 20 γ/1 g Tr.-Sbst. enthalten hatte, wäre bei fehlender Anreicherung diese Dosis von 80 mg viel zu klein; in diesem Fall hätten erst 900 mg der Mischung genügt. Die Ergebnisse des Tierversuchs erlauben also eindeutige Aussagen.

Die Prüfung (A. Hock) der B₁-Wirksamkeit der beiden Präparate im Tierversuch erfolgte nach der von A. Scheunert und Mitarbeitern²⁵⁾ ausgearbeiteten Methode, die von uns schon häufig mit gutem Erfolg angewandt wurde.

Nach diesem Verfahren werden junge wachsende Ratten im Gewicht von 50—60 g mit einer aneurinfreien Grundkost ernährt. Diese Diät hat folgende Zusammensetzung: 16.8 % Casein-vitaminfrei²⁶⁾, 7 % Palmöl, 8 % Lebertran, 5 % Salzgemisch nach McCollum und Davis, 8 % autoklavierte Trockenhefe, 55.2 % (B₁-freie) Reisstärke²⁷⁾.

Die Tiere werden in Einzelkäfigen auf weitmaschigem Drahtnetz gehalten, welches das sofortige Durchfallen der abgesetzten Exkremente ermöglicht. Zunächst wachsen bei dieser Kost die Ratten noch einige Zeit, zeigen aber dann Gewichtsstillstand bzw. rückgang unter gleichzeitiger Entwicklung von Mangelerscheinungen, die dem Krankheitsbild der B₁-Avitaminose entsprechen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Ratten versuchsreif. Es beginnt die eigentliche Versuchsperiode, welche 35 Tage dauert. Für jede Versuchsgruppe werden 10 dieser vorbereiteten Ratten verwendet (nach wie vor in Einzelkäfigen gehalten). Die Tiere erhalten nun das zu prüfende Material als tägliche Zulage.

Die Bedingungen der Methode sind, die niedrigste Dosis zu finden, welche es mindestens 8 von 10 Ratten der betreffenden Gruppe ermöglicht, die Versuchsperiode zu durchlaufen. Dabei wird verlangt, daß 1) die Tiere die Versuchsperiode überleben, 2) daß die etwa zu Beginn der Versuchsperiode bestehenden Krämpfe geheilt werden und neue Erkrankungen an polyneuritischen Krämpfen nicht auftreten. Ferner dürfen

²⁵⁾ A. Scheunert u. M. Schieblich, Handbuch d. Lebensmittelchemie, Berlin 1935, Bd. II, 2. Teil, S. 1548.

²⁶⁾ Die letzte Reinigung des Caseins (verwendet wurde Casein vitamin-frei, Merck) von B₁-Spuren erfolgte mit 60-proz. Alkohol nach Angaben von Bomskov, Methodik der Vitaminforschung. Verlag G. Thieme, Leipzig 1935, S. 168.

²⁷⁾ Von B₁-Spuren durch mehrtägige Alkoholextraktion befreit.

die Tiere am Schluß der Versuchsperiode nicht mehr als 2 g gegenüber dem Gewicht zu Beginn des Versuchs abgenommen haben. Eine Gewichtszunahme der Tiere während der Versuchsperiode ist nicht erforderlich. Diejenigen Ratten, die die genannten Bedingungen nicht erfüllen, gelten als ungenügend.

Definitionsgemäß enthält nun eine Tagesdosis, bei der 8 von 10 Versuchstieren den Versuchsbedingungen entsprechen, 1 Ratteneinheit Vitamin B₁, was nach Untersuchungen von A. Scheunert 1.8 γ Aneurinhydrochlorid entspricht.

V Versuchsergebnisse.

Mit den beiden Mischungen M 1 und M 2 wurden je 3 Versuchsreihen mit Tagesdosen von 80, 100 und 120 mg durchgeführt. In den Tafeln 1 (Mischung M 1) und 2 (Mischung M 2) ist die Zahl der Tiere, die den Versuchs-

Tafel 1.

Tierversuch zur Ermittlung des B₁-Gehaltes von Mischung M 1.

| Tagesdosis in mg | | 80 | 100 | 120 |
|---|----------------|----|-----|-----|
| Zahl der Tiere, die den Versuchsbedingungen | genügten | 7 | 8 | 10 |
| | nicht genügten | 1 | -- | -- |
| Zahl der Tiere, die während des Versuches starben | | 2 | 2 | -- |

Tafel 2.

Tierversuch zur Ermittlung des B₁-Gehaltes von Mischung M 2.

| Tagesdosis in mg | | 80 | 100 | 120 |
|---|----------------|----|-----|-----|
| Zahl der Tiere, die den Versuchsbedingungen | genügten | 2 | 8 | 9 |
| | nicht genügten | 1 | 1 | --- |
| Zahl der Tiere, die während des Versuches starben | | 3 | 1 | 1 |

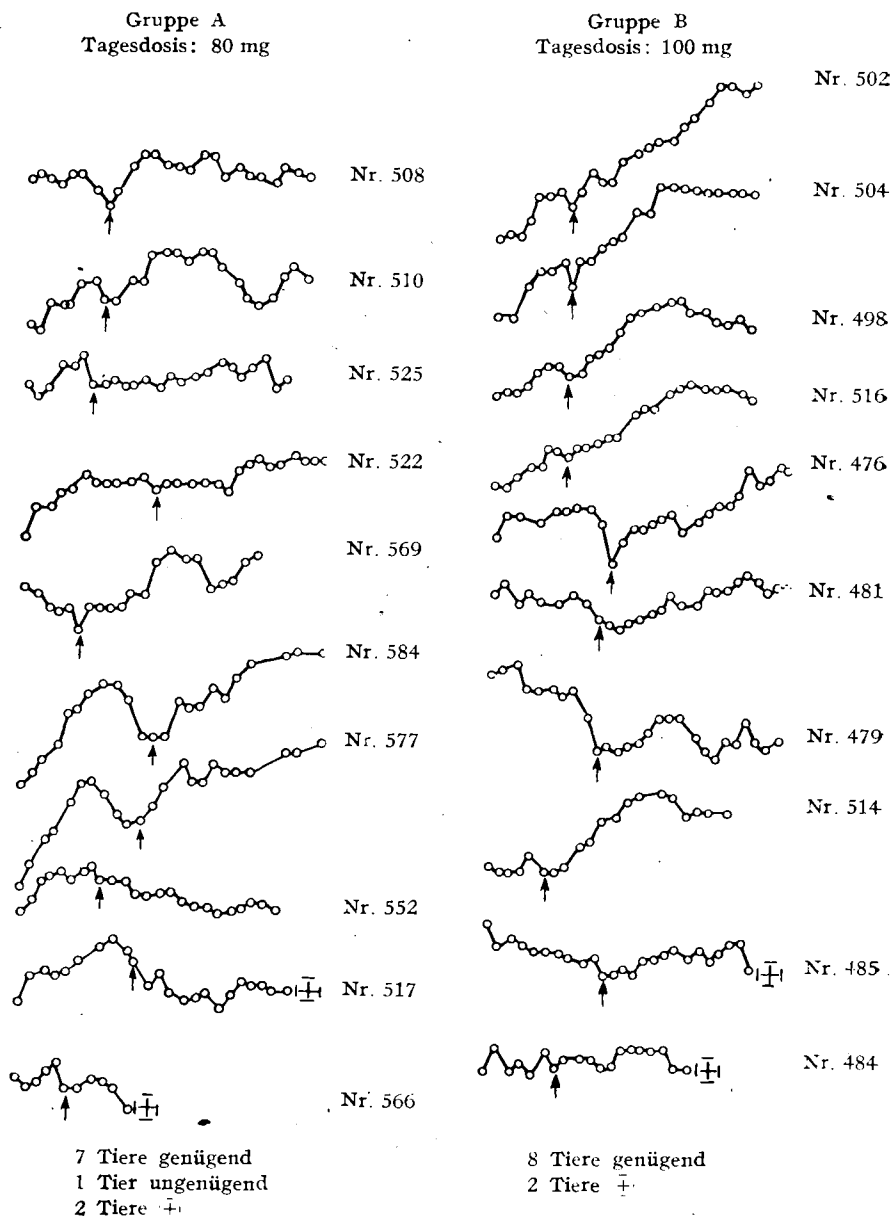
bedingungen (vergl. oben) genügt bzw. nicht genügt hat, für jede Versuchsreihe aufgeführt. Ferner ist in den Abbild. 1 für die Mischung M 1 und den Abbild. 2 für die Mischung M 2 das Wachstum der Tiere für die beiden wichtigsten Versuchsreihen graphisch dargestellt; es sind dies die Reihen, bei denen die verabreichte Tagesdosis für 8 Tiere noch genügte, um die Versuchsbedingungen zu erfüllen bzw. bei denen sie nicht mehr genügte.

Die Versuchsergebnisse mit der Mischung M 1 zeigen, daß eine Tagesdosis von 100 mg ausreichte, damit 8 von 10 Versuchstieren den Versuchsbedingungen entsprachen.

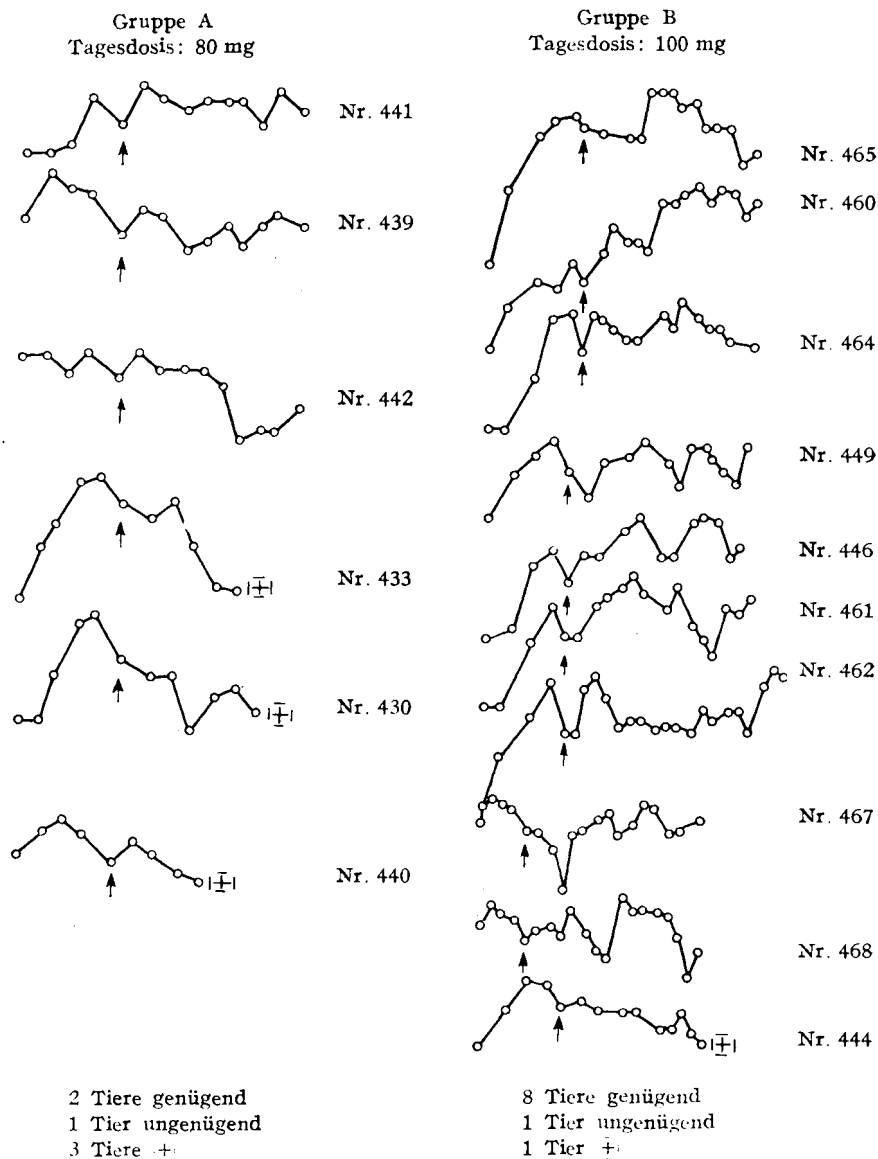
Bei einer Tagesdosis von 80 mg starben bei der Versuchsreihe mit M 1 von 10 Tieren 2, und 1 weiteres hatte am Ende des Versuches gegenüber dem Gewicht bei Versuchsbeginn mehr als 2 g abgenommen. Diese Reihe genügte also offensichtlich den Versuchsbedingungen nicht.

Demnach enthalten also 100 mg der Mischung M 1 mindestens 1 Ratteneinheit = 1.8 γ Vitamin B₁, während 80 mg weniger als 1 Ratteneinheit ent-

Abbildd. 1. Mischung M 1 („OH-Hefe“).



halten. 1 g der Mischung M 1 enthält dann mindestens 18 γ Vitamin B₁ und nicht mehr als 22.5 γ , im Mittel also 20 γ Vitamin B₁. Die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Thiochrommethode ist befriedigend und zeigt, daß die mit der Thiochrommethode gemessenen Werte tatsächlich

Abbildd. 2. Mischung M 2 („NH₂-Hefe“).

mit der antineuritischen Wirksamkeit der Mischung bzw. der dabei verwendeten „OH-Hefe“ übereinstimmen.

Auch bei den Versuchen mit der Mischung M 2 genügten bei einer Tagesdosis von 100 mg 8 von 10 Versuchstieren den Versuchsbedingungen, während bei einer Tagesdosis von 80 mg von 6 Versuchstieren nur 2 Tiere genügten und von den 4 übrigen Tieren 3 starben, ferner eines am Ende des Versuchs

mehr als 2 g abgenommen hatte. Die nicht aufgeführten Tiere wurden wegen des offensichtlichen Ungenügens der Reihe vorzeitig aus dem Versuch genommen.

Der Vitamin-B₁-Gehalt der Mischung war also praktisch der gleiche wie bei Mischung M 1: 1 g enthielt mindestens 18 γ Vitamin B₁ und nicht mehr als 22.5 γ, im Mittel also 20 γ Vitamin B₁. Auch hier ist die Übereinstimmung mit der Thiochrommethode befriedigend und beweist, daß die mit dieser Methode bei der „NH₂-Hefe“ gefundenen hohen Werte einer wirklichen antineuritischen Wirksamkeit entsprechen.

Berichtigung.

B. 75, S. 852, Zeile 10 u. 11 v. u. lies „190 g Na₂SO₃ + 7H₂O in 280 g Wasser“.

Ein Teil der ausländischen, für das vorliegende Heft bestimmten Beiträge konnte aus technischen Gründen nicht mehr aufgenommen werden. Diese Abhandlungen werden in den nächsten Berichte-Heften mit einem Hinweis auf ihre ursprüngliche Bestimmung veröffentlicht werden.

Die Redaktion.
