

Die Bildung eines rotbraunen Pigmentes durch Mikroorganismen bei Anwesenheit von Tryptophan in der Nährlösung

Verschiedene Mikroorganismen scheiden in die Nährlösung ein rotbraunes Pigment aus, wenn ihnen Tryptophan als Stickstoffquelle geboten wird¹⁻³. Versuche mit mehreren *Phycomyceten*- und *Ascomyceten*-Arten ergaben bei 14 von 20 geprüften Stämmen Pigmentbildung bei Anwesenheit von Tryptophan im Milieu (Tabelle I). Jeder Organismus wurde zur Kontrolle des Wachstums mit der in der Originalnährlösung^{1,4-6} angegebenen Stickstoffquelle, mit der Hälfte hiervon und einer entsprechenden Menge Tryptophan sowie nur mit Tryptophan als Stickstoffquelle kultiviert. Die Stickstoffkonzentration in den Nährlösungen betrug einheitlich $10^{-2} M/l$.

Da sich eine tryptophanhaltige Nährlösung beim Sterilisieren (115 °C/15 min) leicht bräunlich färbt, wurde in allen Versuchen das Tryptophan in Wasser gelöst getrennt sterilisiert und nachher der sterilisierten Nährlösung aseptisch zugefügt. Die so hergestellte Nährlösung ist völlig farblos und klar. Sie färbt sich bei längerem Stehen (bis 14 Tage) unter Kulturbedingungen (29 °C, dunkel) leicht bräunlich, etwas stärker unter Belichtung (Fluoreszenzröhren Philips TL 40 W/33, 3000 Lux). Organismen, deren Nährlösung nur die Farbintensität steriler Kontrollen annahm, wurden in Bezug auf ihr Pigmentbildungsvermögen als negativ und nur solche als positiv beurteilt, bei welchen eine kräftige Braunfärbung beobachtet wurde.

Aus *Rhizopus oryzae*-Kulturflüssigkeit⁵ kann das Pigment mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden (Tabelle II). *n*-Butanol und Cyclohexanol extrahieren nur unvollständig. Im Butanolextrakt lässt sich papierchromatographisch Tryptophan nachweisen. Neben dem Tryptophanfleck enthält das Chromatogramm keine mit Ninhydrin, Ehrlich's Reagens⁷ und Nitrit + Naphthylamin⁷ reagierenden Substanzen. Das Pigment selbst ver-

schwindet während des Chromatographierens (Laufmittel: Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:1) und ist auf dem entwickelten Chromatogramm nicht mehr zu lokalisieren. Aus dem Phenol-Chloroformextrakt fällt nach Zugabe von vier Volumteilen Äther ein Niederschlag aus, welcher sich papierchromatographisch wie Tryptophan verhält. Das Phenol-Chloroformgemisch kann im Vakuum bei 50 °C unter Durchleiten von Stickstoff abdestilliert werden. Der Rückstand löst sich in Alkohol mit brauner Farbe und enthält kein Tryptophan mehr.

Das Pigment ist gegen Ansäuerung der Nährlösung mit Essig- und Salzsäure beständig. Versetzt man Nährlösung mit konzentrierter Salzsäure im Verhältnis 1:1, so schlägt die Farbe von braun in purpur um. Neutralisation mit fester Natronlauge lässt wieder die braune Farbe erscheinen. Der Farbumschlag kann wiederholt werden. Mit Cyclohexanol kann das Pigment auch in der purpurnen Form extrahiert werden⁸.

Tabelle II

Extraktionsmittel	Resultat
Äther ^{a, b}	sehr geringes Extraktionsvermögen
Äthylmethylketon	keine Extraktion
Benzin ^a	keine Extraktion
Benzol ^a	keine Extraktion
<i>n</i> -Butanol	gutes Extraktionsvermögen, Extraktion unvollständig
Chloroform ^a	keine Extraktion
Cyclohexanol	wie <i>n</i> -Butanol
Essigsäureäthylester ^b	geringes Extraktionsvermögen
<i>n</i> -Hexan	keine Extraktion
Phenol-Chloroform 1:1 (w/v)	vollständige Extraktion
Petroläther (70 °C, 110/120 °C)	keine Extraktion
Tetrachlorkohlenstoff	keine Extraktion
Xylol	keine Extraktion

^a Kein Unterschied, ob Nährlösung sauer (pH ca. 3) oder mit Na₂CO₃ auf pH 8 gebracht. ^b Bei Extraktion nach ² wird sowohl durch Äther als auch durch Äthylacetat ein sehr geringer Teil des Pigmentes extrahiert. Die Restnährlösung bleibt dunkelbraun gefärbt, mit *n*-Butanol kann weiter extrahiert werden.

Tabelle I

Organismus	Nähr- lösung	Pigment- bildung ^a
<i>Phycomycetes</i>		
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	4	++
<i>M. ramannianus</i> Möller	4	-
<i>Phycomyces blakesleanus</i> Burgeff	4	-
<i>Rhizopus arrhizus</i> Fischer	5	++
<i>R. bovinus</i> v. Beyma	5	-
<i>R. chinensis</i> Saito	5	++
<i>R. circinans</i> v. Tiegh.	5	++
<i>R. nigricans</i> Ehrenbg.	5	-
<i>R. nodosus</i> Namysl.	5	++
<i>R. oryzae</i> W. et Pr. G.	5	++
<i>R. pusillus</i> Naoumoff	5	++
<i>R. pygmaeus</i> Naoumoff	5	++
<i>R. suinus</i> Nielsen	5	++
<i>R. tritici</i> Saito	5	++
<i>Ascomycetes</i>		
<i>Aspergillus niger</i> v. Tiegh.	4	-
<i>Neurospora crassa</i> Shear et Dodge	6	++
<i>Penicillium candidum</i> Link.	1	-
<i>P. chrysogenum</i> Thom.	1	++
<i>P. notatum</i> Westl.	1	++
<i>Rhodotorula rubra</i> (Demme) Lodder	4	++

^a - Nicht stärker als in unbeimpften Kontrollen; ++ sehr kräftig.

Summary. Several *Phycomycetes* and *Ascomycetes* form a reddish-brown pigment if their nutrient medium contains tryptophan. The pigment can be extracted from the medium with *n*-butanol, cyclohexanol, and a mixture of phenol and chloroform 1:1 (w/v).

H. THÖNI⁹

*Pflanzenphysiologisches Institut der Universität
Bern (Schweiz), 2. Februar 1966.*

¹ P. SCHWARZE und O. FRANDSEN, *Planta* 50, 353 (1958).

² F. HAGEMANN, *Arch. Mikrobiol.* 49, 150 (1964).

³ M. POLSTER und M. SVOBODOVA, *Experientia* 20, 637 (1964).

⁴ R. FLURI, *Arch. Mikrobiol.* 33, 195 (1959).

⁵ H. THÖNI, *Arch. Mikrobiol.* 46, 338 (1963).

⁶ G. W. BEADLE, *J. biol. Chem.* 156, 684 (1944).

⁷ H. HELLMANN, *Z. physiol. Chem.* 287, 205 (1951).

⁸ Dr. K. H. ERISMANN danke ich für wertvolle Hinweise und für die Bereitstellung von Material und Hilfsmitteln des Institutes.

⁹ Gegenwärtige Adresse: Statistical Laboratory and Department of Statistics, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa 50010, USA.