

GÄRUNGS-CHEMISCHES PRAKTIKUM

VON

DR. KONRAD BERNHAUER

A. O. PROFESSOR AN DER DEUTSCHEN UNIVERSITÄT IN PRAG
LEITER DER BIOCHEMISCHEN ABTEILUNG
DES CHEMISCHEN LABORATORIUMS

ZWEITE AUFLAGE

MIT 40 ABBILDUNGEN



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1939

ISBN-13:978-3-642-89536-4 e-ISBN-13:978-3-642-91392-1
DOI: 10.1007/978-3-642-91392-1

**ALLE RECHTE, INSBESONDERE DAS DER ÜBERSETZUNG
IN FREMDE SPRACHEN, VORBEHALTEN.**

COPYRIGHT 1936 AND 1939 BY JULIUS SPRINGER IN BERLIN.
SOFTCOVER REPRINT OF THE HARDCOVER 1ST EDITION 1939

Aus dem Vorwort zur ersten Auflage.

Die Gärungschemie hat sich heute weit über ihren ursprünglichen Rahmen (Spirituserzeugung, Bierbrauerei usw.) hinaus entwickelt und ist mit der chemischen Industrie selbst bereits sehr innig verknüpft. So macht sich die Gärungschemie heute auch auf dem Gebiete der organischen Großprodukte immer mehr geltend; es sei z. B. auf die gärungschemische Erzeugung von Aceton, Butanol, Essigsäure, Citronensäure, Milchsäure verwiesen. Ferner ist eine große Anzahl weiterer Gärprozesse bekannt, die noch ihrer industriellen Verwertung harren, wie z. B. die Propionsäuregärung, die Cellulosevergärungen (die zur Erzeugung von Alkohol, Essigsäure, Milchsäure und anderen Produkten könnten) usw. Weiterhin erscheint eine große Reihe von Gärprozessen noch mannigfacher Verbesserungen fähig (Ausbeuteerhöhung, Beschleunigung der Prozesse, Verwendung billigerer Ausgangsmaterialien usw.). Dazu kommt sodann noch eine bedeutende Anzahl der verschiedensten Gärungsvorgänge, die zur Erzeugung mancher organischen Produkte in kleinerem Maße entweder bereits heute dienen oder noch verwertet werden können, so z. B. die Gewinnung von Gluconsäure, Butylenglykol, Mannit, Dioxyaceton usw.

Dabei muß noch weiterhin bedacht werden, daß wir uns — bei der ungemein großen Mannigfaltigkeit der biochemischen Abbauvorgänge — heute zweifellos erst am Anfang der gärungschemischen und gärungstechnischen Entwicklung befinden; denn einerseits werden immer wieder neue Gärungsorganismen aufgefunden, die besondere Prozesse zu bewirken imstande sind, und andererseits sehen wir, daß es durch geeignete Maßnahmen gelingen kann, den Verlauf einer Gärung in andere Richtung zu lenken und so zu anderen Endprodukten zu gelangen (vgl. z. B. die Glycerinerzeugung auf dem Gärwege); schließlich erscheint es auch durchaus möglich, bestimmte, bei den Gärungen rasch durchlaufene Zwischenprodukte mittels besonderer Verfahren so anzuhäufen, daß sie dann als Hauptprodukte auftreten und der technischen Erzeugung zugänglich werden.

Eine weitere große Bedeutung der Gärungschemie für die Industrie beruht darauf, daß die bei den Gärungen vor sich gehenden Umsetzungen vielfach geringere Kosten verursachen als die rein chemischen Prozesse. Bei den Gärungsvorgängen können zumeist billige Ausgangsmaterialien (Kohlehydrate) verwendet werden, wobei vielfach auch die verschiedensten Abfall-

produkte der Landwirtschaft einer industriellen Verwertung zugeführt werden.

Auch in wissenschaftlicher Hinsicht befindet sich die Gärungschemie noch recht am Anfang, denn wenn man bedenkt, wieviel Arbeit geleistet werden mußte, um den Prozeß der Hefegärung — also die physiologische Wirkung einer einzigen Organismengruppe — einigermaßen aufzuklären, so ist leicht ersichtlich, welch ungeheuer großes Gebiet bei Berücksichtigung der ungemein großen Anzahl der Gärungstypen noch der weiteren Bearbeitung harret. Dazu kommt ferner, daß bei der wissenschaftlichen Klärung der Gärprozesse nicht nur der Chemismus der betreffenden Vorgänge aufzuklären ist, also die Art des Reaktionsablaufes, sondern auch die Rolle und Natur der dabei beteiligten Enzyme sowie schließlich der den geordneten Ablauf der Prozesse regulierenden Wirkstoffe; sodann gehören hierher endlich auch die den „physiologischen Zustand“ der Gärungsorganismen betreffenden Fragen.

Während nun auf dem Gebiete der Gärungschemie einerseits recht zahlreiche und vorzügliche Werke vorliegen, die sich in erster Linie und vielfach fast ausschließlich nur mit den Gärungsorganismen selbst befassen, und andererseits eine zweite Gruppe von Werken, die in erster Linie von rein technischen Gesichtspunkten aus geschrieben sind und vor allem nur die älteren, bereits gut durchgearbeiteten Verfahren behandeln, mangelt noch vollständig eine Einführung in die Gärungschemie, in der die laboratoriumsmäßige Durchführung der verschiedensten Gärprozesse geschildert wäre. Die vorliegende Schrift soll dazu dienen, diese Lücke auszufüllen.

Auswahl des Stoffes. Im vorliegenden Buch sind nach Möglichkeit alle Gebiete der Gärungschemie behandelt oder wenigstens gestreift, die in wissenschaftlicher oder technischer Hinsicht von Wichtigkeit erscheinen. Vor allem ist das Hauptgewicht nicht so sehr auf die heute bereits allgemein in die Technik eingeführten Zweige der Gärungschemie gelegt, sondern vielmehr auf jene Gebiete, deren technische Anwendung noch nicht lange zurückreicht, oder die noch einer technischen Verwertung harren, oder die von besonderem wissenschaftlichem Interesse sind. Bei der Auswahl des Stoffes wurde ferner nach Möglichkeit vor allem nur gut Gesichertes und einigermaßen Abgeschlossenes berücksichtigt, doch liegt es in der Natur der Sache, daß vielfach auch noch nicht ganz Abgeschlossenes behandelt werden mußte, um so auch auf die zahllosen noch offenen Probleme der Gärungschemie hinzuweisen.

Die vorliegende Schrift bezweckt daher zunächst eine Einführung in die Gärungschemie, und zwar vor allem in die gärungschemische Praxis. Dadurch soll diese Arbeitsrichtung auch einem größeren Kreis leichter zugänglich gemacht werden und ferner soll das vorliegende Buch auch zur Weiterarbeit auf diesem Gebiete anregen; es wird daher auch immer wieder auf offene Fragen und Probleme hingewiesen. Schließlich dürfte die Bedeutung, die die Gärungschemie heute bereits besitzt, es rechtfertigen, auch bei der Ausbildung der Studierenden an den Hochschulen diesem Gebiete ein erhöhtes Augenmerk zuzuwenden, denn die Gärungsvorgänge stellen vom Gesichtspunkt des Chemikers aus ja auch nur chemische Reaktionsketten vor, bei denen allerdings die Gärungsorganismen selbst bzw. deren Enzyme das „katalytische Agens“ vorstellen. Es erscheint daher auch zur Erweiterung des fachlichen Gesichtskreises der Chemiestudenten von Wichtigkeit, wenigstens einige grundlegende gärungschemische Kenntnisse zu vermitteln, und so auch die chemische Ausbildung universeller zu gestalten.

Übersicht des Stoffes. In der *Einleitung* wird auf die Bedeutung der Gärungschemie kurz eingegangen; sodann werden einige Richtlinien zur Lösung der theoretischen und praktischen Aufgaben der Gärungschemie gegeben, ferner eine Charakteristik und Übersicht der verschiedenen Gärprozesse. Schließlich wird auf die geschichtliche Entwicklung der Gärungschemie in wissenschaftlicher und technischer Hinsicht kurz eingegangen und in diesem Zusammenhang auf einige Probleme dieses Arbeitsgebietes hingewiesen.

Im *ersten Teil* werden die allgemeinen Methoden der Gärungschemie beschrieben, und zwar zunächst die Methoden zur Züchtung und Kultivierung der Organismen, ferner das Wichtigste über die Untersuchung und Charakterisierung derselben. Auf die Wiedergabe von Abbildungen der Gärungserreger wurde verzichtet (ebenso im zweiten Teil), da diesbezüglich einerseits das umfassende Werk von LINDNER¹ vorliegt, und andererseits erst vor kurzem ein sehr instruktiver und preiswerter Atlas der Gärungsorganismen von GLAUBITZ² erschienen ist. Die erwähnten Abschnitte wurden möglichst kurz gefaßt und überall nur das für den Gärungschemiker Wichtigste hervorgehoben. Sodann wird die allgemeine Gärungstechnik geschildert, also die

¹ LINDNER: Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde, 6. Aufl. Berlin 1928.

² GLAUBITZ: Atlas der Gärungsorganismen. Berlin: Parey, 1934.

grundsätzliche Methodik zur Durchführung der Gärungen. Schließlich folgt noch das Wichtigste über die Aufarbeitung der Gäransätze im allgemeinen.

Der *zweite Teil*, der den Hauptteil vorstellt, enthält die Übungsbeispiele. Bei der Beschreibung derselben wurde von dem Grundsatz ausgegangen, gelegentlich der Schilderung der praktischen Durchführung der Gärungen auch theoretische Kenntnisse zu vermitteln; ein Grundsatz, der sich bei anderen Praktikumbüchern bestens bewährt hat¹. Im Anschluß an die einzelnen Übungsbeispiele wird daher eine kurze theoretische Erörterung über den Chemismus der betreffenden Gärungsform sowie über die präparative Bedeutung bzw. die Technologie derselben angeschlossen.

In einem *Anhang* wird eine Übersicht der Einrichtungen für die Durchführung gärungsschemischer Arbeiten gegeben. Ferner sind Umrechnungstabellen zusammengestellt und es werden hier Leitlinien für die Protokollierung entwickelt.

Die Sachverzeichnisse sind so angeordnet, daß aus dem speziellen Sachverzeichnis Bildungsweise und Art der Umwandlung der verschiedenen Gärprodukte ersichtlich ist sowie die Methoden zum Nachweis, zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung.

Herrn Dr. ANTON IGLAUER danke ich für seine eifrige Mit-hilfe, insbesondere bei der Behandlung der biologischen Methoden sowie bei der Durchführung der Korrekturen.

Prag, im Oktober 1936.

KONRAD BERNHAUER.

¹ Vgl. GATTERMANN-WIELAND: Die Praxis des organischen Chemikers, oder BERTHO-GRASSMANN, Biochemisches Praktikum (1396).

Vorwort zur zweiten Auflage.

Die Notwendigkeit, bereits nach zwei Jahren eine Neuauflage des vorliegenden Buches herauszubringen, beweist am besten die Berechtigung desselben. Zugleich ist dies ein Zeichen für das Interesse, das heute der Gärungschemie entgegengebracht wird, sowie dafür, daß die Erkenntnis der Wichtigkeit dieser Arbeitsrichtung in immer größere Kreise dringt. So soll es ja auch weiterhin eine Teilaufgabe dieses Buches bleiben, die Bedeutung der Gärungschemie zu beleuchten, sie den Interessenten leichter zugänglich zu machen und ihr so weitere Mitarbeiter zuzuführen.

Die letzten zwei Jahre haben wieder gezeigt, daß die Gärungschemie in voller Entwicklung begriffen ist und dem, der einen Einblick in die Dinge hat, ist nur noch klarer geworden, wie mangelhaft hier unsere Kenntnisse und Erkenntnisse sind und welch gewaltiges Gebiet hier der weiteren Bearbeitung harret.

Weiterhin konnte in der letzten Zeit gezeigt werden, daß die Gärungschemie dazu berufen ist, auch wichtige und große technische Probleme einer Lösung näher zu bringen. Es sei z. B. auf die biologische Erzeugung von Eiweiß (Gewinnung von Futterhefe) hingewiesen, eine Frage, der gerade in Deutschland im Rahmen des Vierjahresplanes ein großes Augenmerk zugewendet wird. Auch sonst wird der Gärungschemie im Vierjahresplan immer mehr Beachtung geschenkt, was auch in den einschlägigen Veröffentlichungen deutlich zum Ausdruck kommt.

In der vorliegenden Neuauflage konnten Anlage und Rahmen voll aus der ersten Auflage übernommen werden. Naturgemäß wurden die seit dem Erscheinen der ersten Auflage gemachten neueren Erfahrungen auf gärungschemischem Gebiete möglichst vollständig berücksichtigt, wodurch die Neuauflage wieder auf den neuesten Stand gebracht wurde. Dies betrifft nicht nur die Herausarbeitung der Probleme der Gärungschemie in wissenschaftlicher und technischer Hinsicht, sondern vor allem die Erneuerung und Umarbeitung der Übungsbeispiele nach den letzten Veröffentlichungen, sowie nach den im eigenen Laboratorium gemachten Erfahrungen. So wurde auch eine Anzahl von Übungsbeispielen und Abbildungen neu aufgenommen. Die Anzahl der Einzelübungen wurde auf fast 150 erhöht. Die Umarbeitung und Neuaufnahme betrifft vor allem die Erzeugung von Preßhefe (Futterhefe), die

Fettsynthese durch Mikroorganismen, die oxydativen Gärungen der Essigbakterien und Schimmelpilze, bei denen von submersen Verfahren Gebrauch gemacht wird, da diesen die Zukunft gehört. Viele Übungsbeispiele wurden in den letzten zwei Jahren wiederholt überprüft, wobei Verbesserungen gemacht werden konnten.

In einem Nachtrag werden auch noch weitere Literaturangaben hauptsächlich theoretischer Natur gemacht.

Herrn Dr. HEINRICH KNOBLOCH, der in unermüdlicher Weise die Korrekturen und Ergänzungen durchführte, gebührt für seine tatkräftige Mitwirkung an der Verbesserung des Buches mein besonderer Dank.

Prag, im Januar 1939.

KONRAD BERNHAUER.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Einleitung	1
Bedeutung und Entwicklung der Gärungschemie	1
A. Bedeutung der Gärungschemie	1
1. Industrielle Bedeutung der einzelnen Gärprozesse in engerem Sinne	2
a) Die alkoholische Gärung	2
b) Die Butanol-Aceton-Gärung	3
c) Die Essiggärung	3
d) Die Milchsäuregärung	3
e) Die Citronensäuregärung	3
f) Die Cellulosevergärung	3
2. Wirtschaftliche Bedeutung von Gärungsvorgängen und Gärungsorganismen in weiterem Sinne	4
a) Gärungsvorgänge in der Nahrungs- und Futter- mittelerzeugung	4
b) Sonstige industrielle Bedeutung der Gärungs- organismen	5
3. Wissenschaftliche Bedeutung der Gärungschemie	6
a) Aufklärung der Gärungsvorgänge	6
b) Präparative Bedeutung der Gärungschemie	6
B. Einige Richtlinien zur Lösung der theoretischen und praktischen Aufgaben der Gärungschemie	8
1. Methoden zur Aufklärung des Chemismus der Gärungsvorgänge	8
a) Die Gärungszwischenprodukte	9
b) Gärungsendprodukte und Stoffwechselbilanzen	9
2. Richtlinien der technischen Gärungschemie	9
a) Innere Faktoren der Gärprozesse (Gärungs- organismen)	12
b) Äußere Bedingungen der Gärprozesse	13
C. Charakteristik und Übersicht der Gärungsvorgänge	14
1. Allgemeine Charakteristik der Gärungen	15
a) Begriff der anoxydativen Gärungen	15
b) Begriff der oxydativen Gärungen	15
2. Der Chemismus der Gärungs- und Oxydationsvor- gänge im allgemeinen	16
a) Hauptprozeß des Zuckerzerfalls (Abbau über die C ₃ Stufe)	16
b) Nebenprozesse des Zuckerabbaues	17
D. Geschichtliche Entwicklung und Probleme der Gärungs- chemie in wissenschaftlicher und technischer Hinsicht	17

	Seite
1. Die Hefegärungen	17
2. Anoxydative Bakteriengärungen	20
3. Oxydative Bakteriengärungen	23
4. Schimmelpilzgärungen	24

Erster Teil.

Allgemeine Methoden der Gärungschemie.

I. Methoden zur Züchtung und Charakterisierung der Gärungsorganismen	26
A. Geräte und Nährsubstrate zur Kultivierung der Gärungsorganismen	26
1. Gefäße und Geräte	26
a) Gefäße für feste Nährböden	26
b) Gefäße für Nährlösungen	27
c) Geräte für besondere Zwecke	28
2. Die Nährsubstrate und deren Bereitung	28
a) Allgemeine Zusammensetzung der Nährsubstrate	28
b) Allgemeines über die Bereitung und Aufbewahrung der Nährsubstrate	30
c) Natürliche Nährsubstrate	32
d) Künstliche Nährsubstrate	32
3. Sterilisationsmethoden	32
a) Sterilisieren durch Hitze	37
b) Mikrobenfiltration	37
c) Chemische Sterilisationsmethoden	42
B. Methoden zur Züchtung und Charakterisierung der Gärungsorganismen	43
1. Reinzüchtungsmethoden und das Herauszüchten von Gärungsorganismen aus natürlichen Substraten	43
a) Auffindung von Gärungsorganismen in der Natur	43
b) Reinzüchtungsmethoden (Isolierung einzelner Organismen)	45
2. Allgemeine Kulturmethoden zur Fortzüchtung der Gärungsorganismen	47
a) Aerobenkultur	48
b) Anaerobenkultur	48
c) Nährböden für die Fortzüchtung der Gärungsorganismen	49
d) Allgemeine Maßnahmen und Einrichtungen zur Fortzüchtung	49
3. Spezielle gärungschemische Kulturmethoden	50
a) Gewöhnung an Substrate	51
b) Substratwechsel	52
c) Fortlaufende Auswahl der gärkräftigsten Kulturen	53
Anhang: Kulturmethoden zur Keimgehaltsbestimmung	53
4. Mikroskopische Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung der Mikroorganismen	54
a) Anfertigung mikroskopischer Präparate	54

	Seite
b) Färbemethoden	55
c) Messungen unter dem Mikroskop	57
d) Zählungen unter dem Mikroskop	57
C. Übersicht der wichtigsten Gärungsorganismen (morphologische und physiologische Kennzeichnung derselben)	57
1. Hefen	57
2. Bakterien	59
a) Milchsäurebakterien	61
b) Propionsäurebakterien	61
c) Butylogene Bakterien	61
d) Cellulose vergärende Bakterien	65
e) Essigbakterien	65
3. Schimmelpilze (Mycelpilze)	67
II. Methoden zur Durchführung der Gärungen (Gärungstechnik)	72
A. Gärgefäße und Geräte	72
1. Anoxydative Gärungen	72
a) Einfache Gärgefäße	72
b) Gärgeräte mit Rührvorrichtung	72
2. Oxydative Gärungen	74
a) Anordnungen für Oberflächengärungen	74
b) Anordnung für submerse Gärungen	77
B. Die Durchführung der Gärungen	79
1. Das Ansetzen der Gärversuche im allgemeinen	79
a) Vorbereitung der Organismen	79
b) Herstellung der Gärsubstrate	81
2. Die Technik der Gärführung	82
a) Konstanthaltung der Gärbedingungen	82
b) Kontrolle des Gärverlaufes	82
c) Die Durchführung von Bilanzversuchen	82
C. Anhang: Prinzipielles über die Aufarbeitung der Gäransätze	83
1. Gewinnung gasförmiger Gärprodukte	83
2. Gewinnung flüchtiger Gärprodukte	84
a) Isolierung nicht saurer Gärprodukte	84
b) Isolierung flüchtiger Säuren	84
3. Gewinnung nicht flüchtiger Gärprodukte	84
a) Gewinnung schwer löslicher Salze	84
b) Gewinnung leicht löslicher Gärprodukte durch Verdampfung	85
c) Gewinnung von Gärprodukten durch Extraktion	85

Zweiter Teil.

Übungsbeispiele.

I. Hefegärungen	86
A. Züchtung von Hefe und Herstellung von Hefezubereitungen	86
1. Übung: Mikroskopische Hefeuntersuchung	86
a) Bierhefe (untergärige Hefe)	86
b) Preßhefe (obergärige Hefe)	87
c) Weinhefe	88
2. Übung: Züchtung der Hefe	88
a) Hefezüchtung nach dem System der natürlichen Reinzucht	88
b) Hefezüchtung nach dem System der absoluten Reinzucht	89
c) Hefezüchtung in Pasteur-Kolben	89
3. Übung: Prüfung von Wuchsstoffwirkungen bei Hefe Nachweis des Wuchsstoffgehaltes in Bierwürze und Hefeextrakt	91
Anhang: Theoretisches	92
a) Wuchsstoffe der Biosgruppe	92
b) Die Wachstumsfaktoren der Vitamin B-Gruppe	93
4. Übung: Erzeugung von Preßhefe	94
Gewinnung von Backhefe aus Melasse nach dem Lüftungs- und Zulaufverfahren	94
Anhang: Zur Theorie und Praxis der Hefe- erzeugung	97
1. Der Aufbau der Hefesubstanz bei der Preß- heferzeugung (Backhefe sowie Futterhefe)	97
2. Technologie der Preßheferzeugung	99
3. Bedeutung und Verfahren der biologischen Eiweißsynthese (Futterheferzeugung)	100
4. Die Hefe als Nahrungs- und Heilmittel	101
5. Übung: Fettsynthese durch Hefen und Oidien	102
a) Verfettung von Hefe	102
b) Fettbildung durch Oidien (Oospora-Arten)	104
Anhang: Theoretisches	104
1. Die Fettsynthese bei der Hefeverfettung	104
2. Fettbildung durch andere Mikroorganismen	105
6. Übung: Herstellung von Hefezubereitungen	107
a) Lebende frische Hefe	107
b) Lebende „verarmte“ Hefe	107
c) Trockenhefe	107
d) Aceton-Dauerhefe (Zymin)	107
e) Macerationssaft	108
B. Die alkoholische Gärung	108
7. Übung: Die alkoholische Gärung des Zuckers (erste Vergärungsform)	108
a) Kleingärmethode im hohlen Objektträger	108
b) Kleingärversuch im Gärröhrchen	109
c) Gärversuch im Eudiometerrohr	109

	Seite
d) Gärversuch mit analytischer Bestimmung des Alkohols	111
e) Präparativer Gärversuch	112
Anhang I: Technologie der Spirituserzeugung	113
a) Durchführung der Gärung	113
b) Destillation des Alkohols	115
Anhang II: Erzeugung alkoholischer Getränke	115
a) Bierbrauerei	115
b) Weingewinnung	116
c) Gewinnung von Branntweinen	117
Anhang III: Theoretisches	117
C. Die Glyceringärungen und die Gewinnung sowie Umwandlung von Zwischenprodukten	118
8. Übung: Acetaldehyd-Glycerin-Gärung (zweite Vergärungsform)	118
a) Kleinversuch (Demonstrationsversuch)	118
b) Gärversuch mit analytischer Bestimmung von Acetaldehyd und Glycerin	119
c) Präparativer Gärversuch	121
Anhang I: Technologie der Glyceringärung	123
Anhang II: Theoretisches	123
9. Übung: Decarboxylierung der Brenztraubensäure	124
a) Kleinversuch mit frischer Hefe (Demonstrationsversuch)	124
b) Demonstrationsversuch mit Trockenhefe	124
c) Brenztraubensäurespaltung in Gegenwart von Natriumsulfit	125
d) Gärversuch mit quantitativer Bestimmung der Reaktionsprodukte	125
Anhang: Theoretisches	125
10. Übung: Alkalische Gärung (dritte Vergärungsform) Gärversuch mit analytischer Bestimmung der Gärprodukte	127
Anhang: Theoretisches	128
11. Übung: Darstellung der Hexosephosphate	128
a) Darstellung des Hexosediphosphats	128
b) Darstellung des Hexosemonophosphats	129
Anhang: Theoretisches	131
a) Das Fermentsystem der Phosphorylierungsreaktionen	131
b) Das Zymohexase-System	132
12. Übung: Bildung von Methylglyoxal (fünfte Vergärungsform)	134
a) Demonstrationsversuch	134
b) Gäransatz mit quantitativer Bestimmung des Methylglyoxals	135
Anhang: Theoretisches	135
13. Übung: Bildung von Brenztraubensäure und Glycerin (vierte Vergärungsform)	136
a) Demonstrationsversuch mit Hexosediphosphat	136
b) Gäransatz mit Zucker unter quantitativer Bestimmung der Endprodukte	136
Anhang: Theoretisches	138

	Seite
14. Übung: Darstellung der Phosphoglycerinsäure . . .	138
Anhang I: Bildungsweise und Umwandlung der Phosphoglycerinsäure	139
Anhang II: Übersicht des Gärungsschemas	141
D. Acyloinsynthesen und Hydrierungen bei der Hefegärung	144
15. Übung: Darstellung von Phenylacetylcarbinol . . .	144
a) Analytischer Versuch: Isolierung des Phenyl- acetylcarbinols mittels Derivaten	144
b) Präparativer Versuch: Reindarstellung des Phenyl- acetylcarbinols	145
Anhang: Theoretisches	146
16. Übung: Darstellung von Acetoin	146
a) Analytischer Versuch: Isolierung des Acetoin mittels Derivaten	146
b) Präparative Gewinnung von Acetoin	147
17. Übung: Hydrierung von Aldehyden	148
a) Reduktion des Valeraldehyds zu Amylalkohol . . .	148
b) Reduktion von Valeraldehydammoniak	149
c) Reduktion von Chloralhydrat zu Trichlor- äthanol	149
Anhang: Theoretisches	149
18. Übung: Hydrierung von Ketonen	150
a) Demonstrationsversuch: Hydrierung von 1, 4, 9, 10-Anthradichinon.	150
b) Reduktion von Acetophenon zu Methylphenyl- carbinol	151
c) Reduktion von Benzil zu Benzoin	152
Anhang: Theoretisches	152
19. Übung: Hydrierung von ungesättigten Verbindungen und Nitrokörpern	153
a) Reduktion von Zimtaldehyd zu Hydrozimmtalkohol	153
b) Reduktion von Nitrobenzol zu Anilin	154
Anhang: Zum Chemismus der Acyloinsynthesen und Hydrierungen bei der Hefegärung	155
II. Anoxydative Bakteriengärungen	157
A. Die Milchsäure- und Propionsäuregärung	157
20. Übung: Isolierung, Züchtung und Untersuchung der Bakterien	157
a) Isolierung von <i>Lactobac. Delbrückii</i> aus Getreide- maische und Reinzüchtung desselben	157
b) Gewinnung von Milchsäurebakterien und anderen Organismen aus Milch	157
c) Untersuchung von Joghurtpräparaten	158
21. Übung: Herstellung von Impfkulturen und Bak- terienpräparaten	158
a) Herstellung von Impfkulturen	158
b) Herstellung von Massenkulturen der Bakterien . .	159
c) Herstellung von Alkohol-Äther-Trockenprä- paraten der Bakterien	159

	Seite
22. Übung: Die Milchsäuregärung	159
a) Analytischer Gärversuch unter quantitativer Verfolgung des Gärverlaufes	159
b) Präparativer Versuch I: Milchsäuregewinnung aus Stärke	161
c) Präparativer Gärversuch II: Milchsäuregewinnung aus Rohrzucker nach dem Zulaufverfahren	161
Anhang I: Technologie der Milchsäuregärung	162
Anhang II: Grünfuttersilierung	163
23. Übung: Die heterofermentative Milchsäuregärung	164
a) Die Vergärung von Glucose	164
b) Die Vergärung der Fructose	164
24. Übung: Gewinnung und Umwandlung von Zwischen- produkten der Milchsäuregärung	167
a) Bildung von Methylglyoxal	167
b) Dismutation des Methylglyoxals	168
c) Umwandlung der Phosphoglycerinsäure in Brenz- traubensäure	169
Anhang I: Typen der Milchsäuregärung	169
a) Homofermentative Milchsäuregärung	169
b) Heterofermentative Milchsäuregärung	170
Anhang II: Chemismus der reinen Milchsäure- gärung	171
a) Milchsäurebildung über Methylglyoxal als Zwischenprodukt	171
b) Milchsäurebildung über Brenztraubensäure als Zwischenprodukt	172
25. Übung: Die Propionsäuregärung	173
a) Auswahl geeigneter Bakterien	173
b) Analytischer Gärversuch unter quantitativer Verfolgung des Gärverlaufes	173
c) Präparativer Gärversuch	175
d) Bernsteinsäurebildung durch Bakterien-Trocken- präparate	176
26. Übung: Umwandlung von Milchsäure und Brenz- traubensäure in Propionsäure und Essigsäure	176
a) Vergärung von Ca-Lactat unter anaeroben Be- dingungen	176
b) Vergärung von Ca-Lactat unter Messung des entwickelten Gases	177
c) Vergärung von brenztraubensaurem Calcium	177
Anhang: Chemismus der Propionsäuregärung	177
27. Übung: Die Coli- und Aerogenesgärung	180
a) Herstellung von Massenkulturen	180
b) Feststellung des Gärverlaufes bei verschiedenem pH	180
c) Äthanol-Butylenglykol-Gärung	181
Anhang: Chemismus der Coligärungen	182

	Seite
B. Butyl- und Aceton-Gärungen	185
28. Übung: Züchtung und Untersuchung butylogener und verwandter Bakterien	185
a) Anreicherung von butylogenen Bakterien	185
b) Herstellung absoluter Reinzuchten von Butyl- bakterien	186
c) Fortzüchtung der butylogenen Bakterien	187
29. Übung: Die Butanol-Aceton-Gärung	188
a) Kleinversuch mit Auffangung und analytischer Bestimmung der Gase	188
b) Gärversuch mit analytischer Bestimmung aller Gärprodukte und unter Kontrolle der Gas- bildung	188
c) Vergärung unter gleichzeitiger Bildung von Iso- propylalkohol	191
d) Präparativer Gärversuch	192
Anhang I: Theoretisches	194
Anhang II: Technologie der Butanol-Aceton- Gärung	195
30. Übung: Die Buttersäuregärung	196
a) Analytischer Gärversuch	196
b) Präparativer Gärversuch	196
Anhang: Technologie der Buttersäuregärung	197
31. Übung: Zwischenprodukte der Butylgärungen	198
a) Festlegung von Buttersäure und Essigsäure bei der Butanol-Aceton-Gärung	198
b) Umwandlung von Buttersäure in Butanol	198
c) Abfangung von Acetaldehyd bei der Buttersäure- gärung	198
Anhang: Typen und Chemismus der Butyl- gärungen	199
32. Übung: Die Äthanol-Aceton-Gärung	204
a) Analytischer Gärversuch	204
b) Präparativer Gärversuch	204
Anhang: Technologie der Äthanol-Aceton-Gärung	205
33. Übung: Zwischenprodukte der Acetongärung	205
a) Vergärung der Essigsäure zu Aceton	205
b) Decarboxylierung der Acetessigsäure	205
Anhang: Chemismus der Acetongärung	206
C. Cellulosevergärungen	209
34. Übung: Isolierung cellulosevergärender Thermo- bakterien	209
a) Gewinnung und Anreicherung von Rohkulturen	209
b) Isolierung von relativen Reinkulturen cellulose- vergärender Bakterien	209
35. Übung: Vergärung der Cellulose zu Säuren	211
a) Gärversuche zur Auswahl geeigneter Kulturen	211
b) Präparativer Versuch	212
Anhang: Theoretisches	212

	Seite
III. Oxydative Bakteriengärungen	214
A. Die Essiggärung	214
36. Übung: Züchtung und Untersuchung der Essigbakterien	214
a) Isolierung von Essigbakterien aus Bier	214
b) Isolierung von Weinessigbakterien	214
c) Gewinnung von Schnelllessigbakterien	215
d) Herstellung von Impfkulturen für Gäransätze	215
e) Gewöhnung an Substrate	215
f) Aufzüchtungen	215
37. Übung: Gewinnung von Massenkulturen und Bakterienpräparaten	216
a) Herstellung von Massenkulturen in Nährlösungen	216
b) Herstellung von Massenkulturen auf Bieragarnährböden	216
c) Gewinnung „ruhender“ Bakterienkulturen	217
d) Herstellung von Acetontrockenpräparaten	217
38. Übung: Die Essiggärung des Alkohols	217
a) Analytischer Gärversuch in Nährlösungen	217
b) Analytischer Gärversuch mit Massenkulturen	218
c) Präparativer Versuch nach dem Schnelllessigverfahren	218
Anhang: Technologie der Essiggärung	219
39. Übung: Zwischenprodukte der Essiggärung	220
a) Abfangung von Acetaldehyd	220
b) Dismutation des Acetaldehyds unter anaeroben Bedingungen	221
Anhang: Zum Chemismus der Essiggärung	222
40. Übung: Oxydation verschiedener Alkohole	223
a) Oxydation von n-Propylalkohol zu Propionsäure	223
b) Oxydation von Isopropylalkohol zu Aceton	224
Anhang: Theoretisches	224
41. Übung: Alkoholische Gärung der Essigbakterien	225
Anhang: Theoretisches	225
B. Erzeugung von Zuckerarten	226
42. Übung: Darstellung von l-Serbose	226
a) Auswahl geeigneter Bakterien	226
b) Präparative Gewinnung von l-Serbose mittels des Ruheverfahrens	226
c) Präparative Gewinnung von l-Serbose nach dem Durchlüftungsverfahren	227
Anhang: Technische Gewinnung von l-Serbose	227
43. Übung: Darstellung von Dioxyaceton	228
a) Auswahl geeigneter Bakterien	228
b) Präparative Darstellung von Dioxyaceton mittels des Ruheverfahrens	228

	Seite
c) Präparative Darstellung von Dioxyaceton nach dem Durchlüftungsverfahren	229
Anhang: Die Oxydation von Zuckeralkoholen zu Zuckern	229
C. Bildung und Abbau von Zuckercarbonsäuren	230
44. Übung: Darstellung von d-Gluconsäure	230
a) Präparativer Versuch nach dem Ruheverfahren	230
b) Präparativer Versuch nach dem Aufgußverfahren	231
Anhang: Theoretisches	231
45. Übung: Einfache Oxydationsprodukte der d-Gluconsäure	232
a) Darstellung der d-5-Ketogluconsäure	232
b) Darstellung der d-2-Ketogluconsäure	232
IV. Schimmelpilzgärungen	234
A. Kultivierung der Pilze und einfache Oxydationsprozesse	234
46. Übung: Züchtung von Schimmelpilzen und Gewinnung von Sporenkulturen	234
a) Isolierung von Pilzen aus natürlichen Substraten	234
b) Züchtung von Pilzen aus einer einzelnen Conidiospore	234
c) Anlegung von Impfkulturen und Übertragung derselben auf flüssige Substrate	235
d) Abernten reifer Conidiosporen	235
47. Übung: Herstellung von Massenkulturen und Trockenpräparaten	235
a) Massenkultur von Schimmelpilzen zur Gewinnung von Oberflächenmycel	235
b) Erzeugung von submersen Mycel nach der Schüttelmethode	236
c) Herstellung von Trockenpräparaten für enzymchemische Zwecke	236
Anhang I: Theoretisches	237
Anhang II: Technische Erzeugung von Pilzmycel	237
48. Übung: Die Gluconsäurebildung durch Schimmelpilze	237
a) Analytische Versuchsreihe zur Auswahl geeigneter Pilze	237
b) Gluconsäurebildung durch Enzympräparate (Glucoseoxydase)	238
c) Präparativer Versuch in Schalen	239
d) Gluconsäurebildung mittels der Schüttelmethode	240
Anhang I: Theoretisches	241
Anhang II: Technologie der Gluconsäuregärung	242
49. Übung: Die Kojisäurebildung	243
a) Analytischer Versuch und Auswahl eines geeigneten Pilzes	243
b) Präparativer Versuch	244
Anhang: Theoretisches	244

	Seite
B. Oxydative Säuregärungen der Schimmelpilze	245
50. Übung: Die Citronensäuregärung	245
a) Auswahl von Citronensäurebildnern	245
b) Präparativer Versuch	246
Anhang I: Theoretisches	248
Anhang II: Technologie der Citronensäuregärung .	249
51. Übung: Zwischenprodukte der Citronensäuregärung	250
a) Umwandlung von Ca-Acetat in Gegenwart von etwas Zucker	250
b) Umwandlung von Calciumacetat in Gegenwart von etwas äpfelsaurem Natrium und Zucker	251
Anhang: Zum Chemismus der Citronensäure- gärung	251
52. Übung: Die Fumarsäuregärung	254
a) Analytische Versuchsreihe unter zeitlicher Ver- folgung der Säurebildung	254
b) Präparativer Versuch	257
Anhang: Theoretisches	258
53. Übung: Zwischenprodukte der Fumarsäuregärung .	259
a) Umwandlung von Alkohol	259
b) Umwandlung von Essigsäure	260
Anhang: Zum Chemismus der Fumarsäuregärung	260
54. Übung: Die Oxalsäuregärung	261
a) Analytische Versuchsreihe	261
b) Präparativer Versuch	261
Anhang: Theoretisches	261
55. Übung: Die Oxalsäurebildung aus Zwischenpro- dukten	262
a) Umwandlung von Natriumacetat in Oxalsäure .	262
b) Umwandlung von Na-Succinat in Oxalsäure . .	263
c) Umwandlung von Ca-Fumarat unter Bildung von Ameisensäure, Glyoxylsäure und Oxalsäure .	263
Anhang: Zum Chemismus der Oxalsäuregärung . .	263
56. Übung: Alkoholische Gärung der Schimmelpilze .	265
a) Die alkoholische Gärung durch <i>Rhizopus nigri-</i> <i>cans</i>	265
b) Die Sulfitgärung des <i>Aspergillus niger</i>	265
c) Gewinnung von Methylglyoxal	266
Anhang: Beziehungen zwischen der alkoholischen Gärung und den Säurebildungsprozessen bei den Schimmelpilzen	266
Anhang I: Allgemeine Einrichtungen und Anordnungen im gärungschemischen Laboratorium	269
1. Allgemeine Einrichtungen zum Mikroskopieren . .	269
a) Geräte zum Mikroskopieren	269
b) Reagentien und Farbstofflösungen	269
c) Sonstige Hilfsmittel	269

	Seite
2. Anordnungen für die Kultivierung der Organismen	269
a) Einrichtungen zur Züchtung der Gärungsorganismen	269
b) Aufbewahrung der Nährböden und Substrate für die Züchtung der Gärungsorganismen	270
c) Einrichtungen für die Aufbewahrung der Gärungsorganismen	270
3. Allgemeine Einrichtungen für die Durchführung von Gärversuchen	270
a) Vorbereitung der Gärversuche	270
b) Einrichtungen zum Sterilisieren	271
c) Kulturschränke und Gärkammern	272
4. Einrichtungen zur Aufarbeitung der Gärversuche	273
a) Destillierapparate für analytische Zwecke	273
b) Destillationsapparate für präparative Aufarbeitungen	273
c) Extraktionsapparate	273
d) Zentrifugen	273
e) Einrichtungen zur Titration	273
f) Einrichtungen für sonstige analytische Zwecke	273
Anhang II. Umrechnungstabellen und Leitlinien der Protokollführung	274
1. Verschiedene Umrechnungstabellen	274
a) Zuckerkurven	274
b) Die Molekulargewichte und Äquivalentgewichte der wichtigsten Substrate und Gärprodukte	274
c) Die Molekulargewichte der wichtigsten Nährsalze	274
d) Umrechnung der Kohlensäurevolumina	280
2. Leitlinien der Protokollführung	280
a) Protokollierung von Gärversuchen	280
b) Protokollführung über die Kulturen	281
Nachtrag	283
Allgemeines Sachverzeichnis	290
Spezielles Sachverzeichnis: Bildung, Umwandlung, Nachweis und Bestimmung der wichtigsten Gärprodukte	306

Druckfehlerberichtigung:

- S. 52 Note 1 Zeile 4: Statt *B. gluconicum* lies *A. gluconicum*.
 S. 92 Note 4: Statt *Asperzillus* lies *Aspergillus*.
 S. 143 oben: Statt Darstellung von Phenylacetylcarbinol lies Darstellung der Phosphorglycerinsäure.

Einleitung.

Bedeutung und Entwicklung der Gärungschemie.

A. Bedeutung der Gärungschemie.

In der chemischen Industrie, die die Umwandlung der Roh- und Grundstoffe in wertvollere Endprodukte zur Aufgabe hat, nimmt neben den rein chemischen und physikalischen Vorgängen die Erzeugung chemischer Produkte durch biochemische Prozesse in den letzten Jahrzehnten einen immer größeren Raum ein. Vor allem kommt die Gärungschemie auf dem Gebiete der Erzeugung organisch-chemischer Großprodukte immer mehr zur Geltung; neben der Alkoholerzeugung sei z. B. auf die Butanol-, Aceton-, Milchsäure- und Citronensäurefabrikation hingewiesen. Dabei muß noch bedacht werden, daß wir uns — bei der ungemein großen Mannigfaltigkeit der biochemischen Abbauvorgänge¹ — vielfach erst am Anfang der gärungschemischen und gärungstechnischen Entwicklung befinden, und daß sowohl in wissenschaftlicher wie in technischer Hinsicht noch eine ungeheuer große Fülle von Problemen zu lösen ist und daß eine Erschöpfung des diesbezüglichen Forschungsgebietes noch überhaupt nicht vorauszusehen ist.

Weiterhin hat die Gärungsindustrie mannigfaltige Berührungspunkte mit der Landwirtschaft, und zwar nicht nur wegen der zu verarbeitenden Rohprodukte, die von dieser geliefert werden, sondern auch infolge der landwirtschaftlichen Verwertung mancher Nebenprodukte der Gärungsindustrien. Dazu kommt noch die Anwendung von Gärprozessen in der Landwirtschaft selbst, so z. B. bei der Grünfuttersilierung usw.

Aber auch über den Rahmen der eigentlichen Gärungen hinaus können Mikroorganismen große industrielle Bedeutung erlangen; verwiesen sei z. B. auf die Preßhefefabrikation für Backzwecke, ferner auf die Erzeugung von stickstoffhaltigen Futtermitteln (Futterhefe) sowie auf das Problem der Fetterzeugung durch Hefen und Pilze.

Ferner hat die Gärungschemie auch in wissenschaftlicher Hinsicht eine große Anzahl von Fragen und Problemen zu lösen.

¹ Vgl. z. B. FULMER und WERKMAN: An Index to the chemical Action of microorganisms on the nonnitrogenous organic compounds. Springfield, Ill. and Baltimore, 1930.

1. Industrielle Bedeutung der einzelnen Gärprozesse in engerem Sinne.

a) **Die alkoholische Gärung.** Großtechnische Verwertung derselben bei der Spritgewinnung (Brennereispiritus) sowie bei der Erzeugung alkoholischer Getränke (Bier, Wein). Der Alkohol ist mengenmäßig das größte, künstlich in Apparaturen erzeugte organische Produkt. Welterzeugung an alkoholhaltigen Produkten pro Jahr¹:

Bier, etwa 200 Millionen hl im Werte von			
etwa	5,8	Milliarden	Mark
Wein, etwa 150—200 Millionen hl im Werte			
von etwa	5,2	„	„
Sprit, etwa 20 Millionen hl im Werte von			
etwa	1,0	„	„
<hr/>			
zusammen	12,0	Milliarden	Mark

Große wirtschaftliche Bedeutung der alkoholischen Gärungsindustrie: Verwertung von landwirtschaftlichen Produkten in großen Mengen in den Brennereien und Brauereien (Melasse, Kartoffeln, Gerste, Hopfen usw.).

Verwendung des Alkohols: Teilweise für Genußzwecke, die überwiegende Menge (etwa 85 % der Erzeugung) für industrielle Zwecke (in vergälltem sowie unvergälltem Zustand), z. B. als Brennstoff, Treibstoff², als Lösungsmittel in der Spritlackindustrie, als Extraktionsmittel, als Ausgangsmaterial für die Erzeugung von Äthylchlorid, Essigester, Chloroform usw., bei der Erzeugung von Farbstoffen, Pharmazeutica, Riechstoffen usw. Dazu kommen noch die Nebenprodukte der Alkoholherzeugung wie Schlempe, Fuselöl usw.

Verwendung der Fuselöle: Insbesondere als Lösungsmittel in vielen Zweigen der chemischen Industrie, auch in Esterform; manche Ester dienen als Fruchtessenzen.

Sonstige Produkte der Hefegärungen: Glycerin. Dasselbe kann mit befriedigender Ausbeute auf dem Gärungswege erzeugt werden, doch liegen unter normalen Verhältnissen aus der Fettspaltung ausreichende Mengen vor. Im Weltkrieg wurden in Deutschland schließlich monatlich über 1000 t gärungschemisch erzeugt.

¹ Hinsichtlich der hier und im folgenden gegebenen handelsstatistischen Angaben vgl. ULLMANN: Enzyklopädie der techn. Chemie (1928) sowie SCHMID: Die industrielle Chemie in ihrer Bedeutung im Weltbild, de Gruyter & Co., Berlin u. Leipzig 1934. Vgl. weiterhin Hdb. d. Lebensmittelchemie VII. Bd. Alkoholische Genußmittel; Berlin: Julius Springer 1938 (Kapitel über Bier, Wein usw.).

² In Form absoluten Alkohols (für den Betrieb von Explosionsmotoren), entweder als Zusatz zum Benzin oder auch als selbständiges Treibmittel.

Verwendung: Insbesondere in der Sprengstoffindustrie (Nitroglycerin), ferner in der Textil- und Färbereiindustrie (Zusatz zu Druckfarbstoffen), in der kosmetischen und Arzneimittelindustrie (als Weichmachungsmittel), in der Lack- und Kunstharzindustrie (z. B. in Form von Estern), in der Farbenindustrie, im Automobilwesen usw.

b) Die Butanol-Aceton-Gärung. Die Welterzeugung an Aceton soll etwa 10000 t betragen, entsprechend 12 Millionen Goldmark (die auf rein chemischem Wege erzeugte Menge mit eingerechnet). Welterzeugung an Butanol etwa 40000 t.

Verwendung des Acetons: Als Lösungsmittel für Nitrocellulose bei der Fabrikation des rauchlosen Pulvers, für Nitrolacke, zur Erzeugung von Bromaceton (Gaskampfstoff).

Verwendung des Butanols: Als Lösungsmittel in der Lackindustrie (insbesondere für Nitrolacke), teils als solches, teils in Form von Estern. (Ameisensäure-, Essigsäure-, Phthalsäureester); auch zusammen mit anderen Lösungsmitteln (insbesondere Alkohol).

Sonstige Produkte der Butylgärungen: Buttersäure. Verwendung: zur Herstellung von Buttersäureestern des Äthyl-, Benzyl-, Phenylalkohols, Geraniols usw. für die Riechstofffabrikation, in verhältnismäßig beschränkten Mengen. — Umwandlung des technischen Gemisches von buttersaurem und essigsauerm Calcium in Ketone; Verwendung dieser als Lösungsmittel.

c) Essiggärung. Erzeugung der Essigsäure auf dem Gärungsweg in Konkurrenz mit rein chemischen Verfahren. Welterzeugung etwa 270000 t, entsprechen schätzungsweise 190 Millionen Goldmark, davon etwa 40% durch Gärung (30% durch Holzverkohlung und 30% durch Synthese).

Verwendung der Essigsäure: In verdünntem Zustand in der Nahrungsmittelindustrie (als „Essig“), in bedeutendem Maße zur Herstellung von Estern (Methyl-, Äthyl-, Butyl-, Amylacetat), die in der Lack- und Riechstoffindustrie usw. gebraucht werden; ferner zur Erzeugung von Aceton und Essigsäureanhydrid (besonders wichtig für die Herstellung von Acetylcellulose) usw.

d) Milchsäuregärung. Großtechnische Erzeugung der Milchsäure ausschließlich durch Gärung. Weltproduktion etwa 6000 t im Werte von 7,7 Millionen Goldmark.

Verwendung der Milchsäure: Das technische Produkt (43—48%ig) in der Gerberei zum Entkalken der Häute, in der Textilindustrie (zum Griffigmachen von Textilien, Seide, Kunstseide usw.). Reine Milchsäure in der Lebensmittelindustrie (für Limonaden, Fruchtsäfte, Obstwein usw.), zur Beseitigung der Carbonathärte des Brauwassers usw.

e) Citronensäuregärung. Die Erzeugung von Citronensäure auf dem Gärwege bedeutet für die Gewinnung derselben aus Citronen bereits eine bedeutende Konkurrenz. Heute dürfte sogar schon die Hauptmenge der Citronensäure auf dem Gärungsweg erzeugt werden, und zwar in den U. S. A., Belgien, England und der Tschecho-

Slowakei. Die Gesamtproduktion an Gärungs citronensäure dürfte etwa 8000 t pro Jahr betragen, wovon etwa 5000 t in den U. S. A. erzeugt werden¹.

Verwendung der Citronensäure: In der Lebensmittelindustrie, besonders bei der Herstellung von Fruchtsäften und Limonaden; in der Kattundruckerei als Reservage und zur Belebung der Farben; ferner für medizinische Zwecke in der pharmazeutisch-chemischen Industrie. Eine sehr große Bedeutung könnte die Verwendung zur Erzeugung von Kunstharzen erlangen (über Citracon- und Itaconsäure und deren Anhydride), womit auch der Bedarf an Citronensäure sehr steigen würde.

f) Cellulosevergärung. Hierher gehört die Methangewinnung aus Abwasserschlämme durch Methanbakterien; Verwendung des Methans als Leuchtgas (dies wird z. B. in München technisch durchgeführt). Insbesondere die Cellulosevergärung durch thermophile Bakterien könnte eine große Zukunft haben, da die Cellulose das billigste Ausgangsmaterial vorstellt. Es wird dabei Essigsäure, Buttersäure, Alkohol, Milchsäure usw. gebildet. Diese Gärungsvorgänge zu geregelten Prozessen auszugestalten, stellt eine sehr wichtige gärungschemische Aufgabe vor, insbesondere für Länder, in denen ein relativer Mangel an Kohlehydraten besteht.

2. Wirtschaftliche Bedeutung von Gärungsvorgängen und Gärungsorganismen in weiterem Sinne.

a) Gärungsvorgänge in der Nahrungs- und Futtermittel-erzeugung. Über das im vorigen Abschnitt bereits Gesagte hinaus ist vor allem die Milchsäuregärung bei manchen Zweigen der Nahrungs- und Futtermittelindustrie von Bedeutung geworden.

a) Silierung von Grünfütter: Konservierung von eiweißreichem Grünfütter durch Einsäuerung desselben in großen wasserdichten Silos; es findet dabei teilweise Vergärung (Milchsäurebildung) statt. Große Bedeutung der Silierung in der Landwirtschaft: Erzeugung von Saftfütter von großem Eiweißgehalt für den Winter. Die Erhöhung der Grünfüttermenge ist zwecks Steigerung der Tierfetterproduktion erforderlich.

In Deutschland kam die Silobewegung erst durch Schaffung des Vierjahresplanes richtig in Gang. Die Fragen der Futtermittelkonservierung wurden auf breiter Basis wissenschaftlich bearbeitet, in der Landwirtschaft wurde eine systematische Aufklärung betrieben und der Bau von Silos stark gefördert. So stieg allein im Jahre 1935 das Gesamt-fassungsvermögen der Silos von 2,3 auf etwa 3,8 Millionen Kubikmeter.

β) Konservierung von Nahrungsmitteln durch saure Gärungen (Milchsäuregärung): Einsäuerung von Kraut, Gurken usw.

¹ Vgl. dazu WELLS und HERRICK: Ind. Eng. Chem. **30**, 255 (1938). Vgl. auch RAISTRICK in Perspectives in Biochemistry, Cambridge 1938, S. 265.

b) Sonstige industrielle Bedeutung der Gärungsorganismen.

Auch über den Rahmen der eigentlichen Gärungen hinaus können Mikroorganismen große industrielle Bedeutung erlangen, so z. B. bei der Herstellung von Preßhefe für Backzwecke, ferner für die Fetterzeugung und die Gewinnung N-haltiger Nahrungsmittel (Eiweißstoffe, Futterhefe) aus einfach zusammengesetzten Nährlösungen.

a) *Bäckerhefe*. Erzeugung derselben unter Vermeidung der Alkoholbildung. Die Hefeproduktion betrug 1936 in Deutschland etwa 55000 t.

Verwendung der Preßhefe: Hauptsächlich in der Weißbäckerei zum Lockern des Teiges durch Vergärung kleiner Mengen des Mehles (nebenbei Einwirkung proteolytischer Enzyme auf das Mehleweiß); ferner von Bedeutung für die Auffrischung des Sauerteiges. Wichtig ist das Gärvermögen der so erzeugten Hefe (Triebkraft).

β) *Futterhefe*. Es handelt sich hier zunächst um die Verwertung der Brauereihefe, die in großen Mengen anfällt: Umwandlung derselben in versand- und lagerfähige Trockenhefe. Die weitere Aufgabe ist, durch Hefevermehrung aus billigen Ausgangsmaterialien, vor allem Kohlehydraten und anorganischen N-Verbindungen Eiweiß aufzubauen. Die so erzeugte Hefe braucht kein Gärvermögen zu haben; Verwendung sehr schnellwüchsiger Hefen (z. B. Torulaarten). Durch die bahnbrechenden Arbeiten FINKS wurden einige Verfahren ausgearbeitet (je nach den Rohstoffen: Holzzucker, Sulfitablauge, Kartoffeln bzw. Schlempe aus Kartoffelbrennereien). In Deutschland sollen dem Vernehmen nach zunächst 100000 t getrocknete Futterhefe pro Jahr erzeugt werden (enthaltend 50000 t Rohprotein).

Die Wirtschaftlichkeit der Erzeugung von Futterhefe (auch aus den billigsten Rohstoffen) ist immer noch fraglich. Gegen die landwirtschaftliche Erzeugung eiweißreicher Futtermittel (Sojabohnen, Erdnuß, Lupine, Raps usw.) scheint das Verfahren jedoch unter normalen Verhältnissen kaum aufkommen zu können. Jedenfalls ist die Konkurrenz mit dem billigen „Weltmarkteiweiß“ vorläufig noch nicht erreichbar¹.

γ) *Fetterzeugung durch Hefe und Pilze*. Für Zeiten des Fettmangels von großer Bedeutung. Im Weltkrieg wurde der Frage erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt. In Betracht kommt dabei die Verfettung von Hefe oder gewisser Fettpilze wie *Endomyces vernalis*, *Oidium lactis* u. a. Problem noch nicht zufriedenstellend gelöst. Entscheidend ist die Wahl eines geeigneten billigen Ver-

¹ Vgl. die Zusammenfassung von FINK: *Angew. Chem.* **51**, 475 (1938.)

fahrens sowie die Auffindung billiger Ausgangsmaterialien. Durch die Fettsynthese aus Kohle ist das Problem wieder etwas in den Hintergrund getreten.

3. Wissenschaftliche Bedeutung der Gärungschemie.

Wissenschaftliche Forschungen auf dem Gebiete der Gärungschemie sind vor allem in zweifacher Hinsicht von Bedeutung: Einerseits vermitteln uns gerade die Gärungsorganismen eine Anschauung vom Ablaufe relativ einfacher biochemischer Reaktionen und Reaktionsketten unter verhältnismäßig wenig komplizierten Bedingungen. Auf diese Weise kann ein besseres Verständnis auch komplizierterer Lebensvorgänge wie Atmung, Wachstum usw. angebahnt werden. Andererseits sind viele gärungschemische Vorgänge auch für die präparative organische Chemie von Interesse.

a) **Aufklärung der Gärungsvorgänge.** Bedeutung: Es wird die Grundlage für die Entwicklung von Vorstellungen geschaffen, in welcher Weise sich die Zellreaktionen auch bei höher organisierten Lebewesen abspielen mögen. Prinzipielle Einheitlichkeit im Chemismus des Zellgeschehens. Z. B. die Aufklärung der oxydativen Gärungen bietet manche Parallelen zu den Atmungsvorgängen in höher stehenden Organismen (höhere Pflanzen, Tierreich¹). Man vergleiche ferner die Parallele zwischen der Milchsäuregärung und der Glykolyse im Tierkörper usw. Dabei ist die Aufklärung der Vorgänge bei Mikroorganismen oft weniger kompliziert, als bei höheren Pflanzen oder im Tierkörper, da die Gärungen meist durch einzellige Organismen hervorgerufen werden.

b) **Präparative Bedeutung der Gärungschemie.** Vielfach bietet die präparative Darstellung organischer Verbindungen mittels Gärungsorganismen manche Vorteile gegenüber den rein chemischen Darstellungsweisen; in manchen Fällen führt überhaupt nur das biochemische Verfahren zum Ziel. Als präparative biochemische Methoden sind dabei vor allem Oxydationen mittels Essigbakterien, ferner Reduktionen und Acyloinkondensationen mittels gärender Hefe von Bedeutung. So ermöglichen z. B. die Oxydationen mit Essigbakterien eine bequeme Darstellung von Ketosen aus Zuckeralkoholen, ferner die Gewinnung von Zuckercarbonsäuren aus Aldosen und die Oxydation von Zuckercarbonsäuren zu Ketosäuren. Die biochemischen Hydrierungen mittels

¹ Siehe K. BERNHAUER: Erg. d. Enzymforsch. **3**, 220 (1934).

gärender Hefe sind vor allem deshalb von Bedeutung, da sie vielfach die Gewinnung optisch aktiver Körper ermöglichen (z. B. sekundärer Alkohole aus Ketonen), ferner die Reduktion von halogenierten Substanzen (Alkohole aus Aldehyden) ohne Eliminierung des Halogens usw. Daß die biochemischen Reduktionen auch bei recht komplizierten Produkten präparativ von Bedeutung sein können, zeigt die Gewinnung des Testosterons¹. Schließlich ermöglicht die Acyloinkondensation den Aufbau von Substanzen (insbesondere in der aromatischen Reihe), die auf rein chemischem Weg schwierig oder überhaupt nicht darstellbar sind; auch dabei gelangt man zu optisch aktiven Verbindungen. Einige Beispiele zur Beleuchtung der präparativen Bedeutung der Gärungschemie sind in Tab. I wiedergegeben.

Tabelle I.

Prozeß	Gärungsorganismen	Darzustellende Substanz	Ausgangsmaterial
Oxydation	Essigbakterien	Dioxyaceton („Oxanthin“) l-Sorbose Adonose d-Gluconsäure d-Galaktonsäure d-2-Ketogluconsäure d-5-Ketogluconsäure	Glycerin Sorbit („Sionon“) Adonit d-Glucose d-Galaktose d-Gluconsäure d-Gluconsäure
Reduktion	gärende Hefe	sek. l-Butylcarbinol Trichloräthanol Tribromäthanol („Avertin“) d-Propylenglykol l-1,3-Butylenglykol l-2,3-Butylenglykol Octadienol Testosteron	Methyl-äthylacetaldehyd Chloralhydrat Bromal d,l-Milchsäurealdehyd d,l-Acetaldol Diacetyl Octatrienal Androstendion
Acyloinkondensation	gärende Hefe	Methylacetylcarbinol Phenylacetylcarbinol Chlor-Phenylacetylcarbinol p-Methoxyphenylcarbinol	Acetaldehyd-Zusatz Benzaldehyd-Zusatz Chlorbenzaldehyd-Zusatz Anisaldehyd-Zusatz

¹ Vgl. dazu L. MAMOLI: B. 71, 2278 (1938). — MAMOLI u. VERCELLONE: B. 70, 470, 2079 (1937).

B. Einige Richtlinien zur Lösung der theoretischen und praktischen Aufgaben der Gärungschemie.

1. Methoden zur Aufklärung des Chemismus der Gärungsvorgänge.

Bei den verschiedenen Gärprozessen in weitestem Sinne finden nur in wenigen Fällen einfache Reaktionen statt. Dies ist schon daraus ersichtlich, daß die Gärungsprodukte in ihrer chemischen Struktur von den Ausgangskörpern zumeist völlig abweichen. Es handelt sich vielmehr bei den Gärprozessen meist um den Ablauf verwickelter Reaktionsketten, bei denen gewisse Teilreaktionen in andere eingreifen bzw. bei denen Einzelreaktionen mit anderen in oxydoreduktiver Weise gekuppelt sind. Eine wichtige Aufgabe der wissenschaftlichen Gärungschemie ist die Klarlegung der Art des Reaktionsablaufes bei den einzelnen Gärprozessen sowie die Erforschung der die Einzelreaktionen einer Reaktionskette katalysierenden Stoffe. Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten zur Klärung der Gärungsvorgänge, und zwar je nachdem, ob den Gärungszwischenprodukten oder den Gärungsendprodukten das Hauptaugenmerk zugewendet wird. Die Forschungsergebnisse beider Methoden haben einander zu ergänzen.

a) **Die Gärungszwischenprodukte.** Grundsätzlich sind zwei verschiedene Gruppen von Zwischenprodukten zu unterscheiden: nämlich einerseits solche, die aus der Zelle — wenigstens vorübergehend — ausgeschieden werden (ebenso wie die Gärungsendprodukte) und andererseits solche, die normalerweise die Zelle nicht verlassen und in dieser direkt weiter umgesetzt werden. Die gleiche chemische Substanz kann als Gärungszwischenprodukt bei den verschiedenen Gärungen, sowie abhängig von den Versuchsbedingungen, bald der einen, bald der anderen Gruppe angehören. Die erste Gruppe von Zwischenprodukten ist dadurch charakterisiert, daß dieselben in stabilem Zustand auftreten und daher auch im normalen chemisch-physikalischen Zustand von den Gärungsorganismen (bzw. Enzymen) weiter umgewandelt werden (zumeist auch in höheren Konzentrationen verträglich). Zweite Gruppe von Zwischenprodukten: innerhalb der Zelle in labilem Zustand auftretend; werden im stabilen chemischen Zustand von den Organismen (bzw. Enzymen) vielfach nicht weiter umgewandelt; können in diesem Zustand oft sogar giftig wirken; sind in der Regel in höheren Konzentrationen kaum verträglich. Aus dem Gesagten ist zugleich ersichtlich, daß nur bei Substanzen der ersten Gruppe ihre Funktion als Gärungszwischenprodukte

mit Sicherheit bewiesen werden kann, während bei denen der zweiten Gruppe zumeist nur ein Wahrscheinlichkeitsbeweis für ihre Intermediärrolle zu erbringen sein wird. Die Zwischenprodukte dieser zweiten Gruppe sind daher mehr als „Umwandlungsphasen“¹ aufzufassen, die also niemals *direkt* nachweisbar sind, die aber durch bestimmte Maßnahmen bzw. unter bestimmten Bedingungen zum Austritt aus der Zelle und zur Anhäufung im Außenmedium veranlaßt werden können, und zwar sodann in „stabilisierter“ Form, also als wohldefinierbare organische Verbindungen, zum Unterschied von ihrem Zustand in der Zelle.

Die verschiedenen methodischen Möglichkeiten zur Entscheidung der Frage, ob bei irgend einem Gärungsvorgang eine bestimmte Substanz als Zwischenprodukt eine Rolle spielt, sind in Tab. II übersichtlich zusammengestellt.

b) Gärungsendprodukte und Stoffwechselbilanzen. Die Gärungsendprodukte sind dadurch charakterisiert, daß sie stets aus der Zelle ausgeschieden werden und sich im umgebenden Medium ansammeln. Feststellung derselben durch Bilanzversuche: alle Gärungsprodukte, naturgemäß auch die gasförmigen, sind quantitativ zu erfassen. Dabei ist nicht nur die C-Bilanz von Wichtigkeit, sondern auch die Oxydo-Reduktionsbilanz, also die Feststellung, ob neben Produkten, die im Verhältnis zum Substrat oxydiert erscheinen, auch entsprechende Reduktionsäquivalente vorhanden sind. Aufstellung von Stoffwechselbilanzen nicht nur bei normalen Gärungen erforderlich, sondern auch bei Umschaltungen des normalen Gärverlaufes. Die Ergebnisse der Bilanzversuche sind zugleich Prüfsteine für die Richtigkeit eines Gärungsschemas.

2. Richtlinien der technischen Gärungschemie.

Entscheidend für die technische Gärungschemie ist die Gewinnung der gewünschten Gärprodukte in hohen Ausbeuten sowie in möglicher Reinheit (also frei von Nebenprodukten). Dabei ist ferner die Verwendung der billigsten Ausgangsmaterialien und eine möglichst rasche Durchführung des Gärprozesses sehr wichtig. Da es sich dabei um biologische Vorgänge handelt, ist verständlich, daß dieses Ziel nicht leicht erreichbar ist. Da weiterhin die theoretischen Grundlagen der betreffenden Prozesse

¹ Vgl. NORD: *Protoplasma* **10**, 48 (1930); *Erg. Enzymforsch.* **1**, 94 (1932). — *Angew. Chem.* **47**, 491 (1934). — KLUYVER: *Erg. Enzymforsch.* **4**, 237 (1935). — Vgl. auch die Radikalkettentheorie der biochemischen Prozesse von HABER und WILLSTÄTTER: *B.* **64**, 2844 (1931).

Tabelle II.

Allgemeine Methoden	Beispiele	
1. Isolierung und Festlegung von Zwischenprodukten	a) Auftreten von Zwischenprodukten bei normalen Gärungsprozessen; Unterbrechung der Gärung und Feststellung, welche Produkte intermediär auftreten und später wieder unter Bildung von Endprodukten verschwinden	Auftreten und Verschwinden von Buttersäure und Essigsäure bei der normalen Butanol-Aceton-gärung. Auftreten und Verschwinden von Äthanol bei der Fumarsäure-gärung
	b) Anhäufung von Zwischenprodukten durch besondere Maßnahmen. Unterbrechung des Gärprozesses in einem Zwischenstadium; insbesondere Anhäufung von Säuren in Form von Salzen	Anhäufung von Ca-Butyrat und Ca-Acetat in Gegenwart von CaCO_3 bei der Butanol-Aceton-gärung. Anhäufung von Acetaldehyd mittels Ca-Sulfit bei der Essiggärung
	c) Festlegung von Zwischenprodukten durch Verhinderung anschließender Enzymreaktionen durch Zellgifte	Fünfte Vergärungsform (Methylglyoxalanhäufung). (Milchsäuregärung durch Buttersäurebakterien in Gegenwart von CO)
2. Umschaltungen des normalen Gärprozesses	a) Abfangung von Zwischenprodukten mittels besonderer Abfangverfahren (Abfangmittel)	Abfangung von Acetaldehyd bei der zweiten Vergärungsform (Umschaltung der alkoholischen Gärung in eine Acetaldehyd-Glyceringärung)
	b) Umschaltungen durch Milieuänderungen	Alkalische Gärung (dritte Vergärungsform): Umschaltung der alkoholischen Gärung in eine Äthanol-Essigsäure-Glyceringärung
	c) Umschaltungen durch Zellgifte	Anhäufung von Phosphoglycerinsäure in Gegenwart von Na-Fluorid. Anhäufung von Brenztraubensäure-Glycerin in Gegenwart plasmolytischer Stoffe(4. Vergärungsform)

Tabelle II (Fortsetzung).

Allgemeine Methoden	Beispiele
3. Umwandlung von Zwischenprodukten	Decarboxylierung der Brenztraubensäure bei der Hefegärung. Decarboxylierung der Acetessigsäure bei der Acetongärung
	Umwandlung von Acetaldehyd, Essigsäure, Buttersäure usw. bei der Butanol-Acetongärung. Essigsäure \rightarrow Bernsteinsäure \rightarrow Fumarsäure bei der Fumarsäuregärung
	Acetaldehyd \rightarrow Äthanol bei der Vergärung von Hexosediphosphorsäure in Gegenwart von NaF

vielfach noch gar nicht geklärt sind, hängt die richtige Durchführung derselben in hohem Maße von der Erfahrung ab und erst allmählich gelingt es, die Bedeutung der so zahlreichen Faktoren für den Verlauf der verschiedenen Gärungen zu ergründen und sicherzustellen.

Für die Durchführung eines Gärprozesses und insbesondere für dessen technische Verwertung sind zwei Gruppen von Faktoren von grundlegender Bedeutung, nämlich die Auffindung bzw. Auswahl geeigneter Organismen und sodann die Ermittlung geeigneter Bedingungen; es handelt sich dabei demnach um innere wie äußere **Faktoren**.

¹ Als Zwischenprodukte werden auch solche Stoffe anzusehen sein, bei deren Umwandlung nicht unbedingt die Gärungsendprodukte entstehen.

² Bei der Umwandlung von Zwischenprodukten (die nicht schon normalerweise im Milieu auftreten) ist zu beachten, daß sie vor ihrer Umsetzung erst in die Zelle aufgenommen werden müssen (Permeabilität daher sehr wichtig) und weiterhin liegen sie zunächst in stabilem Zustand vor, so daß aus dem Ergebnis ihrer Umwandlung im Versuch niemals ein zwingender Schluß auf ihre Rolle als Zwischenprodukt gezogen werden kann.

12 Einige Richtlinien zur Lösung gärungschemischer Probleme.

a) Innere Faktoren der Gärprozesse (Gärungsorganismen). Die Grundlage für die Durchführung der Gärprozesse, vor allem für deren praktische Anwendung ist die Auswahl der geeignetsten Organismen sowie die Konstanthaltung des Gärvermögens.

a) Anforderungen an die Gärungsorganismen (jene Organismen, die diesen Anforderungen am besten entsprechen, sind dann als die „geeignetsten“ zu bezeichnen):

1. Hohe Gärgeschwindigkeit und hohe Gärtemperatur, zwecks rascher Beendigung des Prozesses.

2. Bildung der gewünschten Gärprodukte in hohen Ausbeuten, unter möglichster Vermeidung von Nebenprodukten.

3. Große Widerstandsfähigkeit gegenüber Milieueinflüssen und Fremdinfectionen.

4. Möglichste Konstanz des Gärvermögens.

β) Methoden zur Gewinnung geeigneter Gärungsorganismen. die diesen Anforderungen am besten entsprechen (die praktische Durchführung wird später besprochen):

1. Auffindung der Gärungsorganismen in der Natur (vgl. S. 43).

2. Prinzipielle Auswahl der geeignetsten Organismen und Stämme. Die einzelnen Gärprozesse können in der Regel nicht nur von einem einzigen bestimmten Mikroorganismus verursacht werden, sondern von einer größeren Anzahl morphologisch verschiedener Gärungserreger; weiterhin treten auch bei einer morphologisch identischen Gruppe von Organismen noch sogenannte Stämme auf (je nach der Isolierung von verschiedenen Fundorten usw.), die sich physiologisch vielfach sehr weit voneinander unterscheiden. Es ist daher von Wichtigkeit, unter den für einen bestimmten Gärungsvorgang in Betracht kommenden Organismengruppen sowie ihren Stämmen den geeignetsten Gärungserreger auszuwählen, was mit Hilfe besonderer Methoden auf Grund oft sehr langwieriger Reihenversuche bewerkstelligt wird (vgl. S. 53).

3. Aufzuchtungen (Gewöhnung an Substrate). Die Gärungsorganismen müssen dabei entweder an bestimmte C-Verbindungen, die sie vergären sollen, gewöhnt werden oder an gewisse Rohsubstrate, die oft wachstumshemmende Stoffe enthalten (z. B. verschiedene technische Abfallprodukte usw.). Methodische Durchführung vgl. S. 51.

4. Konstanthaltung des Gärvermögens; dies geschieht einerseits durch Wechsel des Substrates (wobei vielfach ein Zurückgreifen auf das Substrat des Fundortes erforderlich ist) und

andererseits durch Auswahl der besten Keime (Hochzüchtung) mittels besonderer Methoden (vgl. S. 52).

γ) *Bedeutung von Mischkulturen.* Es wurde vielfach die Beobachtung gemacht, daß manche Gärungen mit einheitlichen, reinen Bakterienkulturen schlechter, bzw. unvollständiger und langsamer verlaufen, als mit bestimmten Mischkulturen; vgl. z. B. die Buttersäuregärung (s. Übung 30 b) und Propionsäuregärung (s. Übung 25 c). Bekanntlich werden auch bei technischen Hefegärungen Mischungen verschiedener Heferassen angewendet. Bei anderen Gärungen wieder bewähren sich Mischkulturen nicht.

b) *Äußere Bedingungen der Gärprozesse.* Auf den Verlauf eines Gärprozesses kann eine große Reihe äußerer Faktoren von entscheidendem Einfluß sein, die den Gärungsvorgang in positivem oder negativem Sinne beeinflussen können. Aufgabe der speziellen Gärungschemie ist die Aufklärung der Bedeutung dieser verschiedenen Faktoren und die Verwertung derselben für die Regulierung des Gärverlaufes. Diese Faktoren sollen hier, nach drei Gruppen geordnet, kurz besprochen werden, und zwar:

a) *Allgemeine (physikalische) Faktoren:*

1. Gärtemperatur, Höhe sowie Konstanz derselben.
2. Physikalische Beschaffenheit des Substrates: Klare Lösungen oder Flüssigkeiten mit suspendierten Anteilen (Anwesenheit der letzteren ist vielfach für die Ansiedlung der Organismen, insbesondere von Bakterien erforderlich).
3. Eventuell kann auch die Konzentration der zu vergärenden Lösungen (insbesondere der C-Quelle) auf die Organismen selbst bzw. deren Wachstum von Einfluß sein¹.

β) *Chemische Zusammensetzung des Gärsubstrates sowie Nährsubstrates* (vgl. auch S. 29); hierher gehört:

1. Art und Konzentration der C-Quelle: so vermögen gewisse Organismen z. B. polymere Kohlehydrate leicht zu spalten, andere nicht usw.
2. Art und Konzentration der N-Quelle; so bedürfen z. B. manche Bakterien organisch gebundenen Stickstoff (Eiweiß oder dessen Abbauprodukte), wogegen wieder bei anderen Gärungen rein mineralische N-Salze am geeignetsten sind.
3. Sonstige Nährsalze; die Zufuhr derselben in geeigneter Form und Menge ist ähnlich wie die der N-Quelle auf den Gärungsvorgang nur indirekt von Einfluß, indem dieselben vor allem für die gewünschte Entwicklung der Organismen von Bedeutung sind.
4. Wasserstoffionenkonzentration, für die verschiedenen Gärungsorganismen sowie Gärungsvorgänge von sehr großer Bedeutung; jeweils sehr verschieden.

¹ Hinsichtlich des Einflusses der Zuckerkonzentration auf die Mycelbildung und das physiologische Verhalten von *Asp. itaconicus* vgl. KINOSHITA: Acta phytochim. 5, 271 (1931); 9, 159 (1937).

5. Metallspuren können einen großen Einfluß auf das Wachstum der Organismen wie auch auf den Gärverlauf haben; Bedeutung derselben noch nicht geklärt. Ihr Einfluß kann sich sowohl bei Laboratoriumsversuchen wie auch bei technischen Gärungen geltend machen, und zwar insbesondere durch das verwendete Gefäßmaterial und Wasser¹.

6. Aktivatoren unbekannter chemischer Zusammensetzung, z. B. aus verschiedenen pflanzlichen oder tierischen Materialien, Früchten, Hefe usw., können nicht nur auf das Wachstum, sondern vielfach auch auf den Gärverlauf von großem Einfluß sein. Derartige Faktoren erscheinen auch für die Art der Verarbeitung natürlicher Substrate von Wichtigkeit. Unsere Kenntnisse über diese Wirkstoffe sind noch sehr mangelhaft. Hierher gehören die v. EULERSchen Faktoren Z_1 und Z_2 (vgl. S. 143), die die Gärung der lebenden Hefe aktivieren, sowie die Gärungsaktivatoren der Butanol-Aceton-Gärung (vgl. Anhang zu Übung 29). Von grundsätzlicher Bedeutung ist hierbei stets die Entscheidung, ob die betreffenden Wirkstoffe das Wachstum und damit indirekt die Gärung oder nur die Gärung selbst beeinflussen.

γ) Art der Gärführung und Gärungstechnik in engerem Sinne (vgl. S. 79):

1. Anaerobe Gärführung, und Regelung derselben.
2. Aerobe Gärführung; Regelung der Sauerstoffversorgung; auch spezielle Methoden (wie z. B. bei der Schnellessigfabrikation).
3. Zusatz verschiedener Stoffe während des Gärprozesses (z. B. Calciumcarbonat zum Abneutralisieren von Säuren usw.).
4. Maßnahmen zur Durchmischung des Gärsubstrates.
5. Kontrolle des Gärverlaufes und Maßnahmen zur Regulierung desselben (z. B. Temperatur, Zusätze usw.).

C. Charakteristik und Übersicht der Gärungsvorgänge.

Bei den eigentlichen Gärungsvorgängen handelt es sich stets um den Abbau von Kohlehydraten. Man kann dabei prinzipiell zwei Vorgänge unterscheiden, nämlich je nachdem ob freier Sauerstoff an dem Prozeß beteiligt ist oder nicht. Es kann dabei daher auch von Atmungs- oder Gärungsvorgängen gesprochen werden, bzw. wenn man den Begriff „Gärung“ in weitestem Sinne (und zwar mehr von technischen Gesichtspunkten aus) anwenden will, von „oxydativen“ und „anoxydativen“ Gärungen. Im eigentlichen Chemismus dieser Prozesse scheint jedoch kein ausgesprochener Gegensatz zu bestehen. Organismen, die normalerweise einen typisch oxydativen Stoffwechsel haben, vermögen unter bestimmten Bedingungen auch anoxydative Gärungen hervorzurufen und umgekehrt.

¹ Hinsichtlich der Biochemie der Metallspuren vgl. z. B. ROBERG: C. Bact. II 84, 196 (1931); FEARON: C. 1933, II 724; BERSIN: Biochem. Z. 245, 466 (1932), Erg. d. Enzymforschung 4, 68 (1935); Z. f. d. ges. Naturw. 1, 187 (1935). FROMHERZ: Umschau in Wiss. u. Technik 42, 957 (1938).

1. Allgemeine Charakteristik der Gärungen.

a) Begriff der anoxydativen Gärungen. Alle Gärungsvorgänge in der ursprünglichen Bedeutung des Wortes („fermentation“, PASTEUR) sind anoxydative Gärungen. Es handelt sich dabei um chemische Vorgänge zur Befriedigung der energetischen Bedürfnisse der Zelle, bei denen der freie Sauerstoff nicht beteiligt ist. Die meisten charakteristischen Gärungsendprodukte (wie Alkohole, Ketone, Säuren usw.) können in der Regel von den betreffenden Organismen unter den Bedingungen des Gärungsvorganges nicht weiter verarbeitet werden und sammeln sich daher an.

Als *Erreger der anoxydativen Gärungsvorgänge* kommen vor allem Hefen und Bakterien in Frage, doch sind auch Organismen, die in der Regel einen typisch oxybiontischen Stoffwechsel besitzen (wie Essigbakterien und Schimmelpilze), häufig zur Durchführung anoxydativer Gärungen befähigt. Dadurch verwischen sich die Grenzen zwischen anoxydativen und oxydativen Gärungserregern; dies ist vielfach auch für die Klärung des Chemismus der betreffenden Gärungsvorgänge von grundlegender Bedeutung.

Zur Charakteristik der anoxydativen Gärungserreger ist noch von Wichtigkeit, daß dieselben entweder in Gegenwart von Sauerstoff wachsen und sich vermehren können (wie z. B. Hefe) oder auch in Abwesenheit desselben (wie viele Bakterien).

b) Begriff der oxydativen Gärungen. Dieselben fallen nur in den Begriff der Gärungen in weitestem Sinne und sind als *Atmungsvorgänge* aufzufassen. Es handelt sich dabei um biochemische Zuckerabbauprozesse, die mit Sauerstoffaufnahme verbunden sind bzw. bei denen der freie Sauerstoff als Wasserstoffacceptor wirkt. In diesem Sinne stellen die Endprodukte der „oxydativen Gärungen“ Zwischenprodukte des Atmungsprozesses vor und es kann auch leicht beobachtet werden, daß diese Produkte unter der weiteren Einwirkung der betreffenden Organismen völlig zu CO_2 oxydiert werden können.

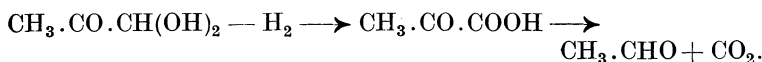
Erreger der oxydativen Gärungen: Vor allem Schimmelpilze und Essigbakterien. Auch Organismen mit einem typisch anoxydativen Stoffwechsel (wie Hefen) sind jedoch in Gegenwart von Sauerstoff zu Reaktionen befähigt, die für die oxydativen Gärungen charakteristisch sind (vgl. Anhang zu Übung 56). Von prinzipieller Bedeutung für den Chemismus der Hauptgruppe der oxydativen Gärungen ist, daß dabei im Anfangsstadium des Zuckerabbaues anscheinend die gleichen Prozesse durchlaufen werden, wie bei den anoxydativen Gärungen (insbesondere bei der Äthanolgärung); nur die „einfachen Oxydationsvorgänge“ stellen einen Sondertypus des Zuckerabbaues vor. Die oxydativen Gärungserreger selbst vermögen nur in Gegenwart von Sauerstoff zu wachsen und die für sie charakteristischen Gärprozesse zu bewirken.

2. Der Chemismus der Gärungs- und Oxydationsvorgänge im allgemeinen.

Im folgenden werden nur die Grundzüge des biologischen Zuckerabbaues durch Gärungsorganismen zusammengefaßt; hinsichtlich einiger Einzelheiten sei auf die bei der Beschreibung der Durchführung der verschiedenen Gärungen anhangsweise angeschlossenen Erörterungen verwiesen (vgl. Übungsbeispiele).

a) Hauptprozeß des Zuckerzerfalls (Abbau über die C₃-Stufe). a) *Der primäre Abbauweg* verläuft (soweit bisher geklärt) wahrscheinlich stets grundsätzlich in der gleichen Weise: Hexose → Phosphorylierungen → primärer C₃-Körper. Die Phosphorylierungsvorgänge bewirken eine Auflockerung des Molekülgefüges und leiten so die Spaltung ein. Der primäre C₃-Körper (Triosephosphorsäure bzw. Methylglyoxal) unterliegt sodann einer weiteren Umwandlung. Physiologische Bedeutung des Methylglyoxals noch nicht völlig klargestellt¹.

β) *Umwandlungen des primären C₃-Körpers*; 1. *Umwandlung der Triosephosphorsäure*: Dehydrierung zu Phosphoglycerinsäure weitere Umwandlung dieser zu Brenztraubensäure → Acetaldehyd + CO₂ (Hefegärung) bzw. → Milchsäure (Milchsäuregärung). Hydrierung zu Glycerinphosphorsäure. 2. *Umwandlungen des Methylglyoxals*: Dismutation zu Milchsäure; ferner (hypothetisch nach KLUYVER): Abbau nach dem Brenztraubensäureschema:



Oder Spaltung nach dem Ameisensäureschema:



¹ Das Methylglyoxal tritt jedenfalls allgemein in der Natur beim Zuckerabbau auf (NEUBERG und KOBEL) und ebenso das Enzym Methylglyoxalase, das die Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure katalysiert. Dies kann in folgender Weise gedeutet werden [TIKKA: Biochem. Z. 279, 264 (1935)]:

1. Entweder ist das Methylglyoxal ein wirkliches Zwischenprodukt, über das der Abbau der Kohlehydrate laufen muß, oder

2. bildet sich dasselbe (wie MEYERHOF annimmt) rein chemisch aus Triosephosphorsäure, falls diese nicht genug rasch weiterdismutiert wird. Die Funktion der Methylglyoxalase wäre dann das giftige Methylglyoxal rasch in Milchsäure überzuführen. Die Methylglyoxalase hätte dann eine ähnliche Funktion wie die Katalase bei der Zerstörung des bei Hydrierungsvorgängen auftretenden gleichfalls giftigen Hydroperoxyds. Fraglich ist dabei, ob die rein chemische Umwandlung des Trioseesters in Methylglyoxal genügend rasch verläuft, um von Bedeutung zu werden.

γ) *Umsetzungen des Acetaldehyds*: 1. Hydrierung zu Äthanol (bei der Hefegärung und verschiedenen Bakteriengärungen). 2. Dehydrierung zu Essigsäure (z. B. bei vielen Bakteriengärungen), weitere Umwandlung der Essigsäure unter Bildung von Aceton (über Acetessigsäure; Acetongärung). 3. Acyloinkondensation unter Beteiligung von nascentem Acetaldehyd und Acetaldehydhydrat. 4. Aldolkondensation (vielleicht bei den Butylgärungen).

δ) *Oxydative Abbauprozesse*, anschließend an den anoxydativen Zuckerzerfall; charakterisiert durch Dehydrierung des Alkohols zu Essigsäure (Essiggärung) sowie Dehydrierung der Essigsäure: Bernsteinsäure-Fumarsäuregärung, Citronensäuregärung (?), sowie weitere Abbauprozesse (Oxalsäuregärung).

b) Nebenprozesse des Zuckerabbaues. α) *Spaltung in C_2 - und C_4 -Ketten*. Angenommen bei der Bernsteinsäurebildung durch verschiedene Bakterien (z. B. bei der Coligärung und Propionsäuregärung; vgl. dazu die Anhänge zu den Übungen 26 und 27).

β) *Direkte Oxydation des Zuckers*, ohne Sprengung der Kette; einfache Oxydationsvorgänge: Bildung von Kojisäure sowie Gluconsäure (u. a.); weitere Oxydation der letzteren zu 2-Ketogluconsäure, 5-Ketogluconsäure und Aldehydgluconsäure (durch Essigbakterien bewirkt); anschließend Abbauprozesse.

D. Geschichtliche Entwicklung und Probleme der Gärungschemie in wissenschaftlicher und technischer Hinsicht.

Die rein empirische Verwertung von Gärungsvorgängen im Gewerbe, ferner in der Landwirtschaft, im Haushalt usw. reichen — wie z. B. die Alkoholgärung und Brotbereitung — in vorgeschichtliche Zeiten zurück. Erst im Laufe der letzten 100 Jahre wurden jedoch die Gärungsvorgänge in wesentlichen Punkten geklärt. Vor allem war es die Hefegärung, die wegen ihrer frühzeitigen technischen Anwendung und auffälligen äußeren Erscheinung zunächst das Interesse erweckte. Erst allmählich kam sodann das Studium und im Anschluß daran auch die technische Verwertung anderer Gärungsformen hinzu. Heute ist dieser Prozeß noch in vollster Entwicklung begriffen und ein Abschluß ist noch überhaupt nicht vor auszusehen.

1. Die Hefegärungen.

Die durch Hefe hervorgerufene alkoholische Gärung ist die am längsten bekannte und verwertete Gärungsform überhaupt. Zunächst zur Herstellung alkoholischer Getränke benützt, und zwar vor allem zur **Bierbereitung**. Herstellung bierartiger Getränke im Haushalt wohl schon in vorgeschichtlicher Zeit; die ältesten geschichtlichen Hinweise in bildlichen Darstellungen der alten Babylonier (vor etwa 7000 Jahren); im 5. Jahrtausend v. Chr. scheinen bereits gewerbliche Brauereibetriebe existiert zu haben. Die Kenntnis der Bierbereitung ging dann auf die Ägypter über. In der hellenischen und griechischen Kulturepoche

stand der *Wein* als Genußmittel im Vordergrund. Bierbereitung bei den Thakern, Skythen, Kelten und besonders Germanen. In der Folgezeit ist dann Deutschland die Hauptpflegestätte der Bierbereitung geworden. Verwendung des Hopfens als Würzemittel bereits in Babylonien; sodann erst wieder im 8.—11. Jahrhundert n. Chr. (FREISING). Erste Bütezeit der Bierbrauerei zu Anfang des 17. Jahrhunderts (Norddeutschland, obergärige Biere), später in Bayern (untergärige Biere, die heute fast überall mit Ausnahme von England die obergärigen verdrängt haben). Einführung der Hefereinzucht in die Bierbrauerei durch CH. HANSEN.

Spirituserzeugung. Ursprung der Alkoholdestillation: wahrscheinlich im 11. Jahrhundert n. Chr. in Italien. Gewinnung von Branntwein aus Getreide etwa im 14. Jahrhundert. Mikroskopische Untersuchung der Hefe 1680 durch LEEUWENHOEK. Wesentliche Fortschritte in der Branntweinbrennerei in technischer wie wissenschaftlicher Hinsicht im 18. Jahrhundert: Feststellung von CO_2 durch MAC BRIDE (1764), Gärungsgleichung nach LAVOISIER, Methoden zur Bestimmung des Alkoholgehaltes (spez. Gew., RÉAUMUR, 1793), Errichtung von Kartoffelbrennereien. Im 19. Jahrhundert wissenschaftlicher Streit über die Ursachen der Gärung und grundsätzliche Klärung des Vorganges (vgl. unten). Ferner bedeutende Fortschritte in der Spiritusbrennerei: Einführung der Hefereinzucht in den Brennereibetrieb durch P. LINDNER. Übergang vom Handbetrieb zum Maschinenbetrieb. Vervollkommnung der Destillierapparate: allmähliche Entwicklung des kontinuierlichen Destillierapparates. Einführung des Hochdruckdampfverfahrens durch HENZE (1873).

Sehr wichtig wurde sodann besonders in neuerer Zeit die Spirituserzeugung aus möglichst billigen Ausgangsmaterialien. Besonders die Verwendung der *Sulfitablauge* wurde dabei von Bedeutung (vgl. S. 114).

Das Problem der *Spirituserzeugung aus Holz* selbst ist bereits über 100 Jahre alt. Problem bis zum Kriegsende noch nicht gelöst (das Stettiner Kriegsverfahren gab nur 6 l Spiritus aus 100 kg Holz). Nach dem Krieg: Verfahren von BERGIUS und SCHOLLER zur Holzverzuckerung (vgl. S. 114), dadurch wesentliche Verbilligung der Spirituserzeugung (dem Verneihen nach beim Scholler-Tornesch-Verfahren fast die Hälfte des bisherigen Preises für Kartoffel- oder Melassespiritus). 100 kg Holztrockensubstanz geben 24 l Spiritus. (Nach dem Scholler-Tornesch-Verfahren wurden in jahrelangem Dauerbetrieb bereits mehrere Millionen Liter Spiritus erzeugt). In Deutschland wurden fünf Großwerke gegründet, die nach diesem Verfahren arbeiten, in Cleveland (Ohio, U.S.A.) wurde ein Riesenwerk geschaffen und auch Japan hat das Verfahren erworben.

Probleme: Weitere Bestrebungen zur Verbilligung der Rohprodukte und Erhöhung der Ausbeute. Versuche zur Anwendung von Hefen mit hoher Gärtemperatur zwecks Beschleunigung des Prozesses.

Kunsthfefabrikation. Entwicklung derselben aus der Getreidebrennerei; erste Anfänge 1766. Vervollkommnung durch CH. HANSENS Forschungen über das physiologische Verhalten der Brennereihefen und Einführung der Hefereinzucht. Durch DELBRÜCK und Mitarbeiter wurde das Verfahren weiter verbessert; Aufstellung des Systems der natürlichen Hefereinzucht. Verbesserungen besonders in der Ausbeute: früher 14—15% Hefe (neben 30—32% Alkohol), dann Verschiebung

des Verhältnisses auf 20–22% Hefe (bei 20% Alkohol), heute nach dem Zulaufverfahren Ausbeuten bis gegen 100%, unter Ausschaltung jeder Alkoholgewinnung.

Neuere Probleme der Kunsthefefabrikation: Verwertung der Bierhefe durch Überführung in eine versand- und lagerfähige Trockenhefe für Nähr- und Futterzwecke. Auch die Umwandlung derselben in Backhefe wurde erwogen (nach der Entbitterung). — Von der heute in Deutschland in Brauereien anfallenden Gesamtmenge an Trockenhefe und Trockentrub von 8500 t im Jahr werden erst 3500 t verwertet¹.

Gewinnung von *Futterhefe (biologische Eiweißsynthese)*. Als Rohstoffe verwendet man entweder Holzzucker oder Sulfitablaue oder Kartoffel bzw. Schlempe (Eiweiß-Schlempe-Verfahren von FINK). Verwendung von *Torula utilis* als Wuchshefe. Die erzeugte Hefe ist in getrocknetem Zustand ein haltbares und sehr wertvolles Eiweißfutter (vgl. S. 5 u. 100).

Das Problem der *Fetterzeugung* durch Hefe und andere Mikroorganismen (neuerdings nach FINK besonders Oidien) war vor allem im Krieg von großem Interesse. Dieses Problem dürfte nun aber durch die nunmehr gelungene synthetische Fetterzeugung aus Kohle² wieder in den Hintergrund treten, falls nicht eine wesentliche Verbilligung in Aussicht steht.

Glycerinerzeugung durch Hefegärung nach der zweiten oder dritten Vergärungsform (vgl. Übung 8 und 10), in technischem Maßstab während des Krieges in Deutschland angewendet („Protolgärung“); Ausarbeitung des Verfahrens durch CONNSTEIN und LÜDECKE³: später vervollkommenet.

Wissenschaftliche Forschungen über das Wesen der Hefegärung. GAY LUSSAC (1810), SCHWANN (1837), KÜTZING, HELMHOLTZ u. a. traten für die vitalistische Anschauung ein, die von seiten der Chemiker (J. v. LIEBIG, J. BERZELIUS, BERTHELOT) heftig bekämpft wurde. PASTEUR entschied zunächst den Streit zugunsten der vitalistischen Anschauung (auf Grund von Versuchen), nachdem E. MITSCHERLICH für die Ansicht eingetreten war, daß die Gärung zwar durch Organismen bewirkt werde, jedoch nicht durch ihre Lebensfähigkeit, sondern durch Kontaktwirkung. Schließlich wurde durch BUCHNERS Entdeckung der Zymase im Hefepreßsaft (1897) der Streit um die Ursachen der Gärung in dem Sinne entschieden, daß die alkoholische Gärung als Enzymreaktion aufzufassen ist, die unabhängig vom lebenden Organismus vor sich gehen kann,

¹ Vgl. ZIEGELMAYER, Rohstoff-Fragen der deutschen Volksernährung, 2. Aufl., Dresden u. Leipzig: Steinkopf 1937, S. 9. — Allein die Naßhefe, die in den Brauereien Deutschlands anfällt, beträgt 36000 t, entsprechend 5000 t Trockenhefe (enthaltend 2800 t Eiweiß); dazu kommt noch der Trub des Kühlschiffes.

² Die z. B. bei der Benzinsynthese nach FISCHER-TROPSCH (CO-Hydrierung) als Nebenprodukte anfallenden höheren Kohlenwasserstoffe werden dabei zunächst zu Fettsäuren oxydiert und diese mit Glycerin verestert. — Vgl. dazu WIETZEL: Angew. Chem. 51, 531 (1938).

³ CONNSTEIN und LÜDECKE: B. 52, 1385 (1919).

wobei jedoch das dabei wirksame Ferment (die Zymase) von der lebenden Hefezelle erzeugt werden muß. Die Folgezeit lehrte dann, daß die Gärung einen sehr komplizierten chemischen Prozeß vorstellt, an dem eine ganze Anzahl von Fermenten beteiligt ist. Die Charakterisierung des Gärprozesses als eine Kette von enzymatisch bewirkten Einzelreaktionen ermöglichte sodann auch Vorstellungen über den Mechanismus der Gärung zu entwickeln und mit der genaueren Aufklärung des Prozesses zu beginnen (NEUBERG, HARDEN, v. EULER, LEBEDEW, MEYERHOF u. a.).

2. Anoxydative Bakteriengärungen.

Milchsäuregärung. Die Milchsäurebakterien (*Lactobacillus*arten) sind Erreger der meisten spontanen Säuerungsvorgänge; daher wurde von der Milchsäuregärung im Haushalt bereits seit Urzeiten Gebrauch gemacht: saure Milch, Sauerteig, Konservierungsmethoden (Einsäuerung wegen der bactericiden Wirkung der freien Milchsäure). Mit spontan aufkommenden Milchsäurebakterien arbeiten heute noch: Sauerkrautfabrikation und Einsäuerungsverfahren von Futtermitteln (Silage). Für manche Milchpräparate (wie Kefir¹, Yoghurt², Kumys³ u. a.) werden die Milchsäurebakterien ohne besondere Kunstgriffe seit Jahrhunderten in gleicher Weise fortgezüchtet. Anwendung von Reinkulturen bei der fabrikatorischen Milchsäuregärung, bei der Milch- und Rahmsäuerung im Molkereibetrieb, Käsereifung, Säuerung des Weißbieres und der Hefemaische (Brennerei).

Milchsäure 1780 von SCHEELE in der sauren Milch entdeckt, 1847 Milchsäuregärung beobachtet von BLONDEAU, 1857 erkannte PASTEUR, daß Bakterien die Säurebildung veranlassen, 1877 isolierte LISTER Reinkulturen von Milchsäurebakterien, 1903 stellten BUCHNER und MEISENHEIMER fest, daß die Milchsäurebildung ein enzymatischer Prozeß ist. Erste Milchsäureproduktion in technischem Ausmaße 1881 durch AVERY in U. S. A. Der Prozeß konnte jedoch erst nach einer Reihe von Jahren zu einem genügend sicheren ausgestaltet werden. 1895 Reinkulturen von *Lactobacillus Delbrückii* durch WEHMER in den Fabriksbetrieb übertragen zur Milchsäuregewinnung bei hoher Gärtemperatur (gegen 50°), Ausbeuten bis zu 90% d. Th. Neuerdings soll die Gärung kontinuierlich durchgeführt werden, nach einem Zulaufverfahren, wobei man zu hohen Konzentrationen an Ca-Lactat gelangt.

Probleme: Gewinnung von Milchsäure aus möglichst billigen Ausgangsmaterialien (Holzzucker, eventuell auch durch direkte Vergärung von Cellulose). Von Interesse erscheint weiterhin die Darstellung der d-Milchsäure (während bei den technischen Gärungen in der Regel

¹ Ein milchsäurehaltiges, schwach alkoholisches, schäumendes Getränk, bereitet mittels eines Gemisches von Hefen und Milchsäurebakterien aus Schaf-, Ziegen-, Kuh- oder Büffelmilch (besonders im Kaukasus erzeugt).

² Mittels Milchsäurebakterien aus Schafmilch oder Kuhmilch bereitet (ein Nationalgetränk der Bulgaren).

³ Analog dem Kefir bereitet (aber aus Stutenmilch), jedoch stärker alkoholisch (etwa bis 2⁰/₀); Ursprung bei den Kirgisen und Tataren.

die d, l-Form gewonnen wird¹) mit Hilfe geeigneter Milchsäurebakterien (z. B. besondere Stämme des *Lactobacillus casei* oder *Delbrückii*²); im tierischen Organismus kann nur die d-Form verwertet werden.

Milchsäure-Essigsäure-Gärung. Insbesondere bei Anwendung billiger kohlehydrathaltiger Ausgangsmaterialien von technischem Interesse; geeignete Stoffe sind Maiskolben, Haferhülsen, Erdnußschalen usw., die zunächst durch Säuren hydrolysiert werden. Anwendung von *Lactobacillus pentoaceticus*: Bildung äquivalenter Mengen Milchsäure und Essigsäure aus Pentosen (z. B. aus hydrolysierten Maiskolben in fast quantitativer Ausbeute innerhalb 10 bis 12 Tagen³).

Mannit-Essigsäure-Gärung (neben Milchsäure). Dieselbe wird durch Vergärung von Fructose durch heterofermentative Milchsäurebakterien verursacht. Bildung von Mannit, Essigsäure und CO₂ im gleichen molaren Verhältnis (aus 3 Mol Fructose⁴). Diese Gärungsform hat auch technisches Interesse gewonnen (z. B. in Italien).

Äthanolgärung der Bakterien. In Form einer gemischten Milchsäure-Äthanol-Gärung bei heterofermentativen Milchsäurebakterien weit verbreitet. Bei manchen Bakterien wird die Äthanolgärung zum Hauptvorgang. So vergärt *Lactobacillus mobile* [*Thermobacterium mobile* (LINDNER)] 90% der Glucose zu Alkohol und CO₂ und nur etwa 7% zu Milchsäure⁵. Neuerdings wird dieser Prozeß in Deutschland in technischem Ausmaße durchgeführt (unter Verwendung eines speziellen Malzes für die Herstellung der Würze).

Äthanol-Butylenglykol-Gärung. Verursacht durch Organismen der Aerogenesgruppe und der *Aerobacillus*gruppe. Man erhält bis zu 30% 2,3-Butylenglykol (bezogen auf angewendeten Zucker⁶). *Bac. asiaticus mobile* (CASTELLANI) vergärt Zucker sehr lebhaft unter Bildung von Äthanol und CO₂ sowie erheblicher Mengen Butylenglykol (28–29%) und Wasserstoff⁷.

Propionsäuregärung. 1841 von NÖLLNER beobachtet. Nachweis der Beziehung zwischen der Lochbildung im Schweizer Käse und dem Gehalt an Propionsäure (JENSEN, 1898). Isolierung von Propionsäurebakterien aus Emmentaler Käse (FREUDENREICH und JENSEN, 1906). SHERMAN und SHAW⁸ erhielten sehr aktive Bakterien, die starke Propionsäuregärung zeigten; Versuche zur Durch-

¹ Es handelt sich dabei um eine Mischung der d-Form mit der l-Form; je nach der Art der verwendeten Bakterien kann auch bei technischen Gärungen z. B. die d-Form stark überwiegen.

² TATUM und PETERSON: *Ind. Chem.* **27**, 1493 (1935).

³ FRED und PETERSON: *Ind. Chem.* **13**, 211, 757 (1921); **15**, 126 (1923). Vgl. auch ALLEN: *Industrial Fermentations*, New York 1926, S. 104.

⁴ BOLCATO: *Ann. Chim. Appl.* **23**, 405 (1933).

⁵ KLUYVER und HOPPENBROUWERS: *Arch. Mikrobiol.* **2**, 245 (1931).

⁶ Vgl. SCHEFFER, Diss. Delft 1928. Ein Verfahren haben FULMER, CHRISTENSEN und KENDALL beschrieben: *Ind. Chem.* **25**, 798 (1933).

⁷ BIRKINSHAW, CHARLES und CLUTTERBUCK: *Biochemic. J.* **25**, 1522 (1931).

⁸ SHERMAN und SHAW: *J. of. biol. Chem.* **56**, 695 (1923); *J. Dairy Sci.* **6**, 303 (1923).

führung der Gärung in technischem Maßstabe: Beendigung des Gärprozesses in 10 Tagen bei 38^o1. Verhältnis Propionsäure:Essigsäure abhängig von den verwendeten Bakterien. Auf die technischen Möglichkeiten für die Propionsäuregärung hat auch VAN NIEL² aufmerksam gemacht (Gewinnung von Organismen, die Propionsäure und Essigsäure im Verhältnis 5:1 bildeten, Beschleunigung des Prozesses usw.). Technische Anwendung hat die Propionsäuregärung bisher noch nicht gefunden.

Buttersäuregärung. Von PASTEUR (1861) zuerst als bestimmte Gärungsform erkannt. Nähere Beschreibung der Gärung und der Bakterien: FITZ (1882), BAIER (1895), WINOGRADSKY (1902), BUCHNER und MEISENHEIMER (1908), BREDEMANN (1909) u. a. Industrielle Verwertung nur in bescheidenem Ausmaße. In wissenschaftlicher Hinsicht von großem Interesse: Kondensationsprozesse; auch höhere Fettsäuren beobachtet (NEUBERG 1921).

Butanol-Aceton-Gärung. Gärungserreger bereits längere Zeit bekannt gewesen, Ausbeuten an Butanol zunächst nur gering (GRIMBERT, 1894, EMMERLING, 1897 bis 1902, BUCHNER und MEISENHEIMER, 1908 u. a.). Industrielle Bedeutung hat diese Gärungsform während des Weltkrieges erlangt (Aceton!); Auffindung geeigneter Gärungserreger. Durchführung des Gärprozesses geht auf FERNBACH (1912) und insbesondere WEIZMANN (1915) zurück. Verfahren besonders in U. S. A. in ungewöhnlich großem Ausmaß in Anwendung. Auch wissenschaftlich von großem Interesse (Kondensationsvorgänge; Reduktion von Carboxylgruppen).

Butanol-Isopropanol-Gärung. Neuerdings von großem technischem Interesse geworden. Verlauf im allgemeinen analog der Butanol-Aceton-Gärung, nur daß an Stelle des Acetons dessen Reduktionsprodukt Isopropylalkohol auftritt.

Äthanol-Aceton-Gärung. Von SCHARDINGER (1905) zuerst beobachtet (*Bac. macerans*), später sind weitere geeignete Bakterien bekannt geworden (*Bac. aceto-äthylicus* u. a.). Versuche zur Aufklärung des Prozesses insbesondere von BAKONYI (1926), der in der Acetonbrennerei eine Zukunftsform der Spiritusbrennerei sieht, da neben dem Alkohol als wertvolleres Produkt Aceton erzeugt wird; es erscheint jedoch fraglich, ob für das Aceton unter normalen Verhältnissen genügend Verwendungsmöglichkeiten vorhanden sind (Verwendung als solches, Reduktion zu Isopropylalkohol, Kondensationsprodukte usw.). Allerdings kann bei manchen Bakterien auch fast ganz die Alkoholproduktion überwiegen (vgl. z. B. ein I. G. Patent 1915). Bei anderen Organismen können neben Äthanol auch noch andere Alkohole auftreten (z. B. Amylalkohol, doch ist dessen Herkunft aus Kohlehydraten fraglich).

Cellulosevergärungen. Erste Beobachtungen hierüber aus dem Jahre 1899 (MAC FAYDEN und BLAXAL). Einwirkung thermophiler Bakterien auf cellulosehaltige Materialien, z. B. bei 60–70^o; Reaktionsprodukte und Verhältnis derselben zueinander sehr verschieden,

¹ WHITTIER und SHERMAN: 15, 729 (1924); 16, 122 (1924).

² VAN NIEL: Die Propionsäurebakterien, Monographie, Haarlem, 1928.

³ VILJOEN, FRED und PETERSON: J. agricult. Sci. 16, 1 (1926); vgl. ferner SCOTT, FRED und PETERSON: Ind. Chem. 22, 731 (1930).

da nur Bakteriengemische (von verschiedener Einheitlichkeit) zur Anwendung gelangten. Bildung von Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure, Äthanol, Milchsäure, CO_2 und H_2 . Ferner gehört hierher die Methangärung. Nach den bisherigen Befunden scheint insbesondere die Erzeugung von Essigsäure in Frage zu kommen. Die Untersuchungen über die Cellulosevergärung durch thermophile Bakterien befinden sich noch recht im Anfangsstadium; diese Gärungen könnten jedoch in der Zukunft von großer wirtschaftlicher Bedeutung werden¹, da die Cellulose das billigste Ausgangsmaterial vorstellt, und in größten Mengen zur Verfügung steht.

3. Oxydative Bakteriengärungen.

Essiggärung². Diese gehört neben der alkoholischen Gärung und der Milchsäuregewinnung zu den am längsten bekannten und verwerteten Gärprozessen. Erzeugung von Essigsäure im Altertum wie im frühen Mittelalter im Haushalt, indem man Wein oder andere alkoholische Flüssigkeiten in der Wärme unter Zutritt von Luft der Säuerung überließ. Etwa im 14. Jahrhundert Entwicklung einer eigenen Industrie; Erzeugung von Bier- und Weinessig in ruhenden Maischen nach dem langsamen Verfahren, später nach dem holländischen Verfahren („BOERHAAVE-Verfahren“), schließlich nach dem Schnell Essigverfahren (1815–1826, SCHÜTZENBACH). 1793 als oxydativer Prozeß erkannt (LAVOISIER), 1837 die Rolle der „Essighaut“ richtig gedeutet (KÜTZING), 1868 mit der Lebenstätigkeit von Organismen in Zusammenhang gebracht (PASTEUR), sodann Auffindung und Reinzüchtung von Essigbakterien (HANSEN, ZEIDLER, LAFAR, SEIFERT, ROTHENBACH, HENNEBERG, BEIJERINCK, HOYER). 1903 Entdeckung der Alkoholoxydase (bzw. -dehydrase) der Essigbakterien (BUCHNER und MEISENHEIMER). Klärung des Chemismus in neuester Zeit (WIELAND, NEUBERG und deren Mitarbeiter).

Gluconsäuregärung. Zuerst beobachtet von BOUTROUX bei der Einwirkung von *Mycoderma aceti* auf Glucose (1878). Später eine große Anzahl von Essigbakterien als geeignet befunden. In Gegenwart von CaCO_3 Gluconsäureerzeugung durch fast alle Bakterien in hohen Ausbeuten, in saurer Lösung insbesondere durch *Acetobacter gluconicum* (HERMANN, 1928), ferner durch Bakterien aus „Hoshigaki“ (TAKAHASHI und ASAI, 1930). Technische Erzeugung von Gluconsäure mittels Essigbakterien vorläufig nicht sehr aussichtsreich, da Schimmelpilze geeigneter.

Probleme: Auffindung neuer Formen mit stärkerem Oxydationsvermögen (Verkürzung des Vorganges) und Durchführung des Prozesses analog der Sorboseerzeugung.

Dioxyacetondarstellung. Oxydation von Glycerin zuerst beobachtet von BERTRAND (*Sorbosebacterium*, 1898), in der Folgezeit bei einer großen Anzahl von Bakterien festgestellt. Technische Anwendung zur Erzeugung von Dioxyaceton („Oxanthin“, I. G.) und Ver-

¹ Vgl. MAY und HERRICK: U. S. Dep. of Agr. (Washington) Circular Nr. 216 (1932).

² Literatur: WÜSTENFELD: Technologie der Essigfabrikation, Berlin 1929; vgl. ULLMANN: Enzyklopädie der technischen Chemie, IV. Bd., S. 616 (1929), dort auch weitere Literatur.

24 Geschichtliche Entwicklung und Probleme der Gärungschemie.

wendung desselben als Diabeteszucker (inzwischen durch den Sorbit „Sionon“, I. G. wieder verdrängt).

Sorboseherstellung. Oxydation von Sorbit zuerst von BERTRAND bei *Acetobacter xylinum* beobachtet (1896), später auch bei anderen Bakterien. Die Sorbose dient als Ausgangsmaterial zur synthetischen Darstellung der l-Ascorbinsäure (Vitamin C)¹. Zur Erzeugung eignet sich am besten das submerse Druckverfahren in der rotierenden Gärtrommel (vgl. S. 79).

4. Schimmelpilzgärungen.

Citronensäuregärung. Entdeckt von WEHMER (1893) bei Penicillien (Citromycesarten) sowie anderen Pilzen. Technische Darstellung von Citronensäure zuerst in der Chemischen Fabrik in Thann und Mühlhausen i. E. versucht, basierend auf Patenten von WEHMER. Die technischen (apparativen) Schwierigkeiten konnten jedoch damals nicht überwunden werden (WEHMER, 1893). Von Wichtigkeit wurde die Verwendung des widerstandsfähigeren und gärkräftigeren *Asp. niger* in U. S. A. durch ZAHORSKY (1913); von grundlegender Bedeutung die Untersuchung von CURRIE (1917). Doch währte es noch viele Jahre, bis das Verfahren fabrikationsreif war. In den letzten 6–8 Jahren hat sich sodann die Citronensäureherstellung auf dem Gärwege einen Platz in der Gärungsindustrie erobern können. Durchforschung der Citronensäuregärung in wissenschaftlicher Hinsicht insbesondere etwa in den letzten 10–15 Jahren.

Probleme: In technischer Hinsicht Anwendung billigerer Ausgangsmaterialien, Verbilligung der Erzeugungstechnik. Vor allem die Ausarbeitung eines technisch brauchbaren submersen Verfahrens würde eine völlige Umwälzung der diesbezüglichen Gärtechnik bewirken. — In wissenschaftlicher Hinsicht: Der Chemismus der Citronensäuregärung ist bis heute noch nicht endgültig geklärt. Auch die Bedeutung der für die Citronensäuregärung maßgebenden Faktoren ist noch nicht völlig ermittelt.

Gluconsäuregärung. Bei Pilzen (*Asp. niger*) 1922 von MOLLARD entdeckt; in der Folgezeit bei vielen Pilzen beobachtet. Als enzymatischer Prozeß von MÜLLER (1928) charakterisiert. Sodann Aufindung von Pilzen mit starkem Vermögen zur Gluconsäurebildung auch in Abwesenheit von CaCO_3 (HERRICK und MAY, 1929). Technische Möglichkeiten des Prozesses insbesondere bei Anwendung roher Ausgangsmaterialien. Zur technischen Erzeugung von Gluconsäure auf dem Gärungsweg kommt heute vor allem das submerse Verfahren (in der rotierenden Gärtrommel) in Betracht (HERRICK und MAY 1937). Ferner kommt die Gewinnung der Gluconsäure aus den Mutterlaugen der Citronensäurefabrikation auf dem Gärungswege in Frage.

Fumarsäuregärung. Zuerst von EHRlich bei *Mucor stolonifer* beobachtet (1911), sodann von WEHMER (1918) ein sehr gärkräftiger Pilz (*Asp. fumaricus*) aufgefunden, der allerdings später sein Säurebildungsvermögen änderte. Auch durch *Mucor stolonifer* wird Fumarsäure in Gegenwart von CaCO_3 in recht beträchtlichen Mengen angehäuft (BUTKEWITSCH, 1929). Technische Möglichkeiten vorläufig

¹ REICHSTEIN und GRÜSSNER: Helv. Chim. Acta 17, 311 (1934).

noch fraglich (Umwandlung von Fumarsäure in Weinsäure oder Äpfelsäure); eventuell auch direkte weitere Umwandlung von Fumarsäure in Äpfelsäure (BERNHAEUER, 1936). In wissenschaftlicher Hinsicht sehr interessanter Prozeß: Bildung der Fumarsäure über Alkohol, Essigsäure und Bernsteinsäure wahrscheinlich gemacht (BUTKEWITSCH).

Probleme: Ausarbeitung eines Verfahrens zur technischen Erzeugung von Fumarsäure bzw. Äpfelsäure. In wissenschaftlicher Hinsicht: Klärung des Chemismus.

Oxalsäuregärung. Zuerst beobachtet von DE BARY (1886) bei *Sclerotinia* sp., später auch bei *Pen. glaucum* und *Asp. niger*. 1891 von WEHMER Bildung großer Mengen Oxalsäure beobachtet und Bedingungen des Prozesses näher geklärt. Technische Bedeutung besitzt diese Gärungsform kaum, da die Oxalsäure auf rein chemischem Weg billig erhältlich ist. In Frage kommt höchstens die Oxalsäuregewinnung aus Holz mittels holzerstörender Pilze (*Coniophora cerebella*; FALCK). Chemismus des Prozesses noch nicht endgültig geklärt.

Kojisäuregärung. Zuerst beobachtet von SAITO (1907) bei *Asp. oryzae*. (Konstitution der Kojisäure erst 1924 von YABUTA ermittelt). In jüngster Zeit in guten Ausbeuten durch *Asp. flavus* erhalten (MAY und Mitarbeiter, 1931). Prozeß bisher ohne technisches Interesse, da noch keine Verwendungsmöglichkeit der Kojisäure aufgefunden ist.

Mannitgärung der Schimmelpilze; insbesondere durch weiße Aspergillusarten hervorgerufen. Ausbeuten bis zu 50% des verarbeiteten Zuckers (RAISTRICK und Mitarbeiter, 1932).

Erster Teil.

Allgemeine Methoden der Gärungschemie.

Wir haben hier sinngemäß einerseits biologische und andererseits chemische Methoden zu unterscheiden. Wir werden uns also zunächst mit der Züchtung und Charakterisierung der Gärungsorganismen und sodann mit der Art der Durchführung der Gärungen selbst, also der Technik der Gärführung zu beschäftigen haben. Schließlich wird noch das Wichtigste über die Aufarbeitung der Gäransätze und die Gewinnung der Gärprodukte zusammengefaßt.

I. Methoden zur Züchtung und Charakterisierung der Gärungsorganismen¹.

A. Geräte und Nährsubstrate zur Kultivierung der Gärungsorganismen.

1. Gefäße und Geräte.

Im folgenden wird zunächst auf die wichtigsten Gefäße zur Kultivierung von Mikroorganismen hingewiesen und deren Verwendungszweck kurz charakterisiert; sodann werden auch einige Geräte für besondere Zwecke angeführt.

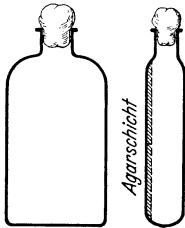


Abb. 1.
ROUX-Kolben.

a) **Gefäße für feste Nährböden.** *Proberöhren:* Für Agar- oder Gelatinenährböden usw. in Schrägkultur (aerobe sowie fakultativ aerobe Organismen) sowie in Stiehkultur (anaerobe Organismen).

Vierkantfläschchen: Zum Anlegen von Schrägkulturen (z. B. für Riesenkolonien).

ROUX-Kolben (vgl. Abb. 1): Zum Gießen von Agar- und Gelatineplatten zwecks Reinzüchtung oder zwecks Herstellung von Impfmateriale (z. B. bei Pilzen).

PETRI-Schalen und *DRIGALSKI-Schalen* (Glaschalen mit übergreifendem Deckel): Zum Gießen von Agar- und Gelatineplatten zwecks Reinzüchtung, ferner zur Züchtung von Organismen in größeren Massen (zumeist für oxydative Organismen).

¹ Zusammenfassende Literatur:

LAFAR: Hdb. d. techn. Mycologie. Jena 1904—1914, 5 Bände.

FUHRMANN, F.: Einführung in die Grundlagen der technischen Mycologie. Jena 1926.

MEYER, A.: Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903 (behandelt die bakteriologischen Arbeitsmethoden).

LEHMANN, K. B. und R. O. NEUMANN: Bakteriologische Diagnostik, 7. Aufl. München 1927 (besonders für Anfänger bestimmt, enthält zugleich die Arbeitsmethoden und eine Beschreibung der einzelnen Organismenarten; im ersten Teil ein Atlas mit teilweise farbigen Tafeln).

OLSEN: Bakteriologisches Taschenbuch, 28. Aufl. Leipzig 1927.

BABES-Schalen (analog den **PETRI-Schalen** gebaut, aber Unterteil mit einer Ausnehmung versehen, in der der Deckel aufsitzt): Verwendungszweck wie **PETRI-Schalen**.

b) Gefäße für Nährlösungen. *Arzneifläschchen* (von 10—50 ccm Inhalt): Zur Kultivierung von Organismen in verschiedenen Nährlösungen (meist für Hefen und Bakterien).

FREUDENREICH-Kölbchen (vgl. Abb. 2) und **CHAMBERLAND-Kölbchen** (analog aber kolbenförmig); 10 bis 50 ccm Inhalt, Anwendung wie zuvor. Ermöglichen ein sauberes Arbeiten (bei der Impfung), zugleich wird Verstauben der Watte durch die Glaskappe vermieden; das obere Rohr kann zu einer Capillare ausgezogen werden, um die Verdunstung einzuschränken.

HANSEN-Kölbchen (analog dem **FREUDENREICH-Kölbchen**, aber mit seitlichem Impfstutzen, auch in Form der **CHAMBERLAND-Kölbchen**, aber mit seitlichem Ansatz): Verwendungszweck wie zuvor. Impfung erfolgt durch das Seitenrohr, das sodann mit Gummischlauch und Glasstöpsel verschlossen wird; ebenso das Aus-



Abb. 2.
FREUDENREICH-Kölbchen.

(Besonders für den Mediziner bestimmt, enthält Vorschriften für Färbungen, Nährböden und Kulturverfahren.)

KOCH, A.: Mikrobiologisches Praktikum. Berlin: Julius Springer 1922. (Eine zweckmäßige Anleitung für Übungen in der landwirtschaftlichen Bakteriologie.)

JANKE, A.: Allgemeine technische Mikrobiologie, I. Teil, Mikroorganismen. Dresden-Leipzig 1924. (Behandelt die Morphologie und Systematik der Mikroorganismen; enthält zahlreiche Literaturangaben.)

JANKE-ZIKES: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden-Leipzig 1928.

KLIMMER, M.: Technik und Methodik der Bakteriologie und Serologie. Berlin 1923. (Beschreibung der wichtigsten Methoden.)

KRAUS und UHLENHUT: Hdb. d. mikrobiologischen Technik. 3 Bände. Berlin 1923. (Nachschlagewerk; behandelt die gebräuchliche Methodik und Technik.)

BREFELD, O.: Die Kultur der Pilze. Münster 1908.

KÜSTER, E.: Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. Leipzig 1921. (Züchtung der Pilze und anderer Mikroorganismen.)

WILL: Anleitung zur biologischen Untersuchung und Begutachtung von Bierwürze, Bierhefe, Bier und Brauwasser, zur Betriebskontrolle sowie zur Hefereinzucht. Münster und Berlin 1909.

KLÖCKER: Die Gärungsorganismen. Stuttgart 1924. (Arbeitsverfahren für die Untersuchung der Organismen der Gärungsgewerbe und Beschreibung der wichtigsten Organismen.)

LINDNER, P.: Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 6. Aufl. Berlin 1930. (Mehr für den Gärungschemiker von Beruf bestimmt.)

gießen des Inhaltes z. B. zwecks Einimpfung in einen PASTEUR-Kolben, vgl. unten).

ERLENMEYER-Kolben: Insbesondere für alle aeroben Organismen; geringe Schichthöhe (große Oberfläche).

Stehrundkolben (Kochkolben): zur Züchtung von Bakterien und Hefen in größeren Mengen.

e) Geräte für besondere Zwecke. **PASTEUR-Kolben** (Abb. 3): Zur Züchtung von Hefe in größerem Maßstab (insbesondere im Rein-zuchtbetrieb in Verwendung). Impfstutzen mit Gummischlauch und

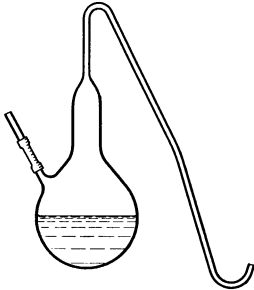


Abb. 3. PASTEUR-Kolben.

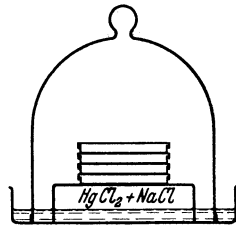


Abb. 4. Feuchte Kammer.

Glasstöpsel verschlossen. Handhabung des PASTEUR-Kolbens, vgl. Übung 2c. (Sterilisation erfolgt durch direktes Erhitzen im Sandbad.)

Feuchte Kammer (vgl. Abb. 4): Dient zur Aufbewahrung von Kulturen in PETRI-Schalen oder Epruvetten usw. in vor Verdunstung geschütztem Zustand.

Doppelschalen bzw. **Glasdosen** (ähnlich den PETRI-Schalen oder BABES-Schalen, aber von 4–5 cm Höhe): Für Gipsblockkulturen oder zur Aufnahme von Kartoffelscheiben usw.

Apparate zur Anaerobenzüchtung, vgl. S. 48/49.

2. Die Nährsubstrate und deren Bereitung.

a) Allgemeine Zusammensetzung der Nährsubstrate. Die Zusammensetzung und Anwendung der verschiedenen Nährsubstrate ist je nach der Art der Organismen und deren physiologischen Bedürfnissen sehr verschieden.

LINDNER, P.: Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde. 6. Aufl. Berlin 1928.

HENNEBERG, W.: Hdb. d. Gärungsbakteriologie. Berlin 1926. (Als Nachschlagewerk sehr zu empfehlen; auch für den Gärungschemiker von Beruf bestimmt.)

MIGULA: Das System der Bakterien. Jena 1897. (Botanisch-systematisches Werk über Bakterien.)

GLAUBITZ: Atlas der Gärungsorganismen, Parey. Berlin 1934.

Unterscheidung von *natürlichen* und *künstlichen Nährsubstraten*; erstere aus Naturprodukten des Tier- und Pflanzenreiches hergestellt; chemische Zusammensetzung nicht genau bekannt (hergestellt durchweg unter Benutzung von Leitungswasser); letztere aus chemisch wohl definierten Stoffen hergestellt, meist unter Benutzung von Mineralsalzen (mineralische Nährsubstrate) unter Verwendung von destilliertem (oft auch doppelt destilliertem¹) Wasser, manchmal auch Leitungswasser.

Unterscheidung der Nährsubstrate in *feste Nährböden* (unter Anwendung von Agar-Agar² oder Gelatine hergestellt) und *Nährlösungen*; erstere insbesondere für Reinzüchtungen angewendet, letztere vor allem zur Herstellung von Impfkulturen der Bakterien und Hefen.

Ernährungsphysiologisch notwendige Elemente und sonstige Stoffe:

Kohlenstoff: Meist in Form von Kohlehydraten oder Eiweißstoffen oder verwandten Substanzen.

Stickstoff: Entweder in Form von Eiweißstoffen (Fleischextrakt, Hefewasser usw.) bzw. deren Abbauprodukten (Pepton, Aminosäuren) oder in Form von anorganischen N-Salzen (wie Ammonsulfat, -nitrat, -phosphat, K- oder Na-Nitrat).

Phosphor: Fast stets in Form von Phosphaten, entweder in organischer Bindung vorhanden (in manchen natürlichen Nährböden) oder als anorganische Salze zugesetzt (meist KH_2PO_4 oder K_2HPO_4).

Schwefel: Fast stets in Form von Sulfaten.

Kalium: Meist als Kaliumsulfat oder Kaliumchlorid.

Magnesium: Gewöhnlich in Form von MgSO_4 .

Sonstige Elemente: Ausreichende Mengen Calcium und Eisen sind meist zugegen, ebenso Chloride (besonders bei Anwendung von Leitungswasser) sowie *Schwermetallspuren*, die vielfach die Entwicklung der Organismen fördern (Wachstumsstimulatoren). Vgl. dazu S. 93.

Wuchsstoffe: In natürlichen Substraten, insbesondere aus dem Pflanzenreich, in der Regel vorhanden; die meisten Mikroorganismen vermögen sie selbst zu bilden (auch in künstlichen Nährsubstraten), andere können ohne dieselben nicht wachsen (die Wirkung entspricht daher Wachstumshormonen bzw. Wachstumsvitaminen). Vgl. dazu S. 92/93.

Bedeutung der Glassorte für die Nährböden. Da gewöhnliches Geräteglas stark Alkali abgibt und so das pH des Nährbodens manchmal sehr ändern kann, empfiehlt sich bei empfindlichen Organismen die Verwendung von Jenaer Geräteglas oder einer anderen Glassorte, die

¹ Zur Ausführung genauer ernährungsphysiologischer Untersuchungen. Destillation unter Benutzung von Platin- oder Quarzgeräten.

² Als Ersatz für Agar-Agar kann auch Pektin verwendet werden (dagegen ist „Opekta“ ungeeignet). Vgl. FUNK: Klin. Wschr. 16, 1546 (1937).

kein oder nur wenig Alkali abgibt. Das verwendete Glas soll stets einer „physiologischen Waschung“ unterzogen werden, indem die Glasgeräte des öfteren mit verdünnter Salzsäure (etwa 3 %ig, in Leitungswasser) am siedenden Wasserbad behandelt und dann gründlich zunächst mit Leitungswasser, zum Schluß mit destilliertem Wasser gespült werden¹. Chromschwefelsäure ist zum Waschen von Glasgeräten für mikrobiologische Zwecke grundsätzlich zu vermeiden.

Die Ermittlung sowie Einstellung des pH -Wertes der Nährböden ist von größter Bedeutung; auf die diesbezüglichen Methoden braucht hier jedoch nicht eingegangen zu werden, da eingehende zusammenfassende Beschreibungen vorliegen². Für rasche und zumeist genügend genaue Messungen sei insbesondere auf das Folienkolorimeter von P. WULFF³ hingewiesen, das die kolorimetrische pH -Messung auch in dunklen sowie stark getrüben Lösungen und in Suspensionen ermöglicht.

b) Allgemeines über die Bereitung und Aufbewahrung der Nährsubstrate. *Bereitung künstlicher Nährlösungen*: Herstellung von Stammlösungen der betreffenden Nährsalze in 10—20fach konzentriertem Zustand, von denen je nach Bedarf abpipettiert wird. C- und natürliche N-Quellen werden in der Regel erst vor Gebrauch gelöst. Peptonlösungen sind zumeist zu filtrieren.

Bereitung natürlicher Nährsubstrate, sehr verschieden, vgl. unten. Aufbewahrung derselben vgl. unten.

Filtration fester Nährsubstrate (Agar- und Gelatinenährböden) ist zumeist erforderlich, insbesondere für Reinzüchtungen. Vornahme der Filtration unter Benutzung von Watte oder eines Faltenfilters, am besten im Dampfsterilisator: Die vorbereitete heiße Flüssigkeit wird aufgegossen und das Ganze in den Dampftopf gestellt; der meist trüb durchgehende erste Anteil ist nochmals aufzugießen. Diese Methode empfiehlt sich auch sonst zur Filtration schwer filtrierender wäßriger Flüssigkeiten. In besonderen Fällen Benutzung eines mit Kieselgur imprägnierten Filters.

Klärung von Nährsubstraten. Mittels *Eiweiß*: Das Weiße eines Hühnereies (in einer Schale zu Schaum geschlagen) wird in das 40—50° warme Nährsubstrat (2 l) unter kräftigem Rühren eingetragen; im Wasserbad oder Dampftopf bis zum Gerinnen des Eiweißes und Klarwerden der Flüssigkeit erhitzt und dann filtriert.

¹ Diese Vorbehandlung des Glases soll man sich bei allen biologischen wie gärungschemischen Versuchen zum Grundsatz machen. Näheres vgl. CZURDA: Beihefte bot. C. 51, 730 (1933), sowie ONDRATSCHEK: Arch. f. Mikrobiol. 6, 532 (1935).

² Vgl. z. B. BERTHO-GRASSMANN: Biochemisches Praktikum, Berlin: de Gruyter 1936, u. a.

³ P. WULFF: Kolloid-Ztschr. 40, 341 (1926); Chem. Ztg. 50, 732 (1926); Chem. Fabr. 6, 441 (1933).

Auch *Tierkohle*, *Bolus alba* oder *Asbestwolle* bewähren sich vielfach: Zusatz zum Nährsubstrat (auf 2 l 20 bzw. 10 g), aufkochen, filtrieren. Oder Anwendung von *Klär-schichten* aus *Kieselgur* (nicht über 1 mm stark): Zusatz von Kieselgur zu einem Teil der Lösung, filtrieren und Rest nachgießen. Klärung von Bierwürze: Filtration über Tonerde oder Talkum. In den meisten Fällen führt auch die Verwendung von *Seitz-Filtern* zum Ziel.

Abfüllen von Nährlösungen. Ein Benetzen des Gefäßrandes ist unbedingt zu vermeiden, um ein Befeuchten der Watte zu verhüten. Benutzung von Pipetten oder speziellen Abfüllbüretten mit entsprechender Einteilung (vgl. Anhang I 3 a).

Abfüllen von festen Nährsubstraten. Verwendung einer Vorrichtung zum sterilen Abfüllen von Agar- oder Gelatinenährböden (vgl. Abb. 5), die sich im hiesigen Laboratorium bestens bewährt hat. Handhabung derselben: Der mit dem sterilen Nährboden gefüllte Apparat wird bis zur vollständigen Verflüssigung des Substrates erwärmt, sodann umgedreht (wie in der Abb.) und nun mit der Abfüllung in Proberöhren usw. begonnen. Bei Schrägagar werden die mit Watte versehenen sterilen Proberöhren etwa zu $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ des Volumens gefüllt und dann schräg gelegt, so daß keine Benetzung der Watte erfolgt¹; für Stichkulturen zur Hälfte gefüllt und aufrecht gestellt.

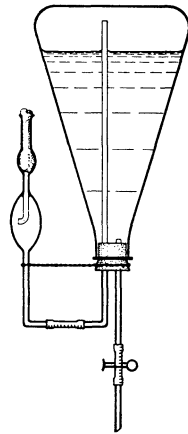


Abb. 5. Abfüllapparat.

Aufbewahrung von Nährböden (besonders natürlicher Substrate): in sterilem Zustand in größeren Vorratsgefäßen (niemals mehr als etwa 500 ccm in einem Gefäß) oder in abgefülltem Zustand: stets an kühlen, trockenen, staubfreien, nach Möglichkeit dunklen Orten; die Trockenheit des Aufbewahrungsortes ist sehr wichtig, da sonst die Watteverschlüsse nicht mehr genügende Sterilität verbürgen, und durch dieselben verschiedene Organismen eindringen können. Andererseits ist durch Aufbewahren bei tiefer Temperatur (am besten im Eisschrank)

¹ Falls man das sogenannte „Quetschwasser“ vermeiden will, werden die Röhrchen erst nach dem Abkühlen des Agars auf 40–50° schräggelegt. Für manche Organismen (z. B. manche Schimmelpilze und Bakterien) ist jedoch das Vorhandensein des „Quetschwassers“ von Vorteil (vgl. dazu auch S. 32, Note 1).

ein Austrocknen von Agarröhrchen usw. zu verhindern¹. Man bezeichne die aufzubewahrenden Nährsubstrate stets sehr genau, und zwar nicht nur die Zusammensetzung derselben, sondern auch die Art der Sterilisation und Datum der Herstellung.

Ein monatelanges Aufbewahren von Nährböden ist unbedingt zu vermeiden, da dieselben dadurch in der Regel unbrauchbar werden. Die meisten Organismen gehen auf alten Nährböden schlecht, manche gar nicht mehr an. Dies dürfte mit der allmählichen Zerstörung von Wuchsstoffen oder anderen Umsetzungen zusammenhängen.

e) **Natürliche Nährsubstrate.** Es handelt sich hier um Substrate, die keine chemisch definierte Zusammensetzung haben. Als Ausgangsmaterialien zur Herstellung derselben dienen in der Regel direkt oder indirekt Naturprodukte. Flüssige Nährsubstrate werden vielfach mittels Agar oder Gelatine verfestigt. Die Anordnung der verschiedenen Nährböden in den Tabellen ist folgende:

Flüssige Nährböden für Hefen und Schimmelpilze, vgl. Tab. III.		
„ „ „ Bakterien, vgl. Tab. IV.	„	„
Feste „ „ Hefen und Schimmelpilze, vgl. Tab. V.	„	„
„ „ „ Bakterien, vgl. Tab. VI.	„	„

Viele dieser Nährböden kommen vor allem zur Fortzüchtung der Organismen in Betracht, andere für Reinzüchtungen und diagnostische Zwecke und wieder andere für Versuchszwecke, also für Stoffwechseluntersuchungen u. a.

d) **Künstliche Nährsubstrate.** Aus der großen Zahl der beschriebenen Nährsalzmischungen sind in Tab. VII nur einige der wichtigsten zusammengefaßt. Diese Nährsubstrate kommen fast nur zur Kultivierung von Organismen für Versuchszwecke in Frage, nicht aber zur Fortzüchtung selbst.

3. Sterilisationsmethoden.

Die Erzielung steriler Nährsubstrate ist von grundlegender Bedeutung. Prinzipiell sind dabei drei Methoden zu unterscheiden: Sterilisation durch Hitze, Mikrobenfiltration und Sterilisation durch chemische Mittel.

¹ So kann man z. B. beobachten, daß manche Organismen zu ihrer Entwicklung auf festen Nährböden vielfach sogar des „Quetschwassers“ bedürfen (z. B. *Acetobacter gluconicum*).

Tabelle III.

Nr.	Art des Nährsubstrates	Herstellungsweise	Sterilisation	pH	Verwendungszweck
1	Bierwürze („süße Würze“)	Ungehopfte Brauereiwürze auf die gewünschte Konzentration verdünnt (meist 8° Bllg.) ¹	fraktioniert, 3 mal je 30 Min.	6	Schimmelpilze, Hefen
2	Malzwürze	200 g geschrotetes Malz mit 1 l Leitungswasser auf 45° und dann je 5 Minuten um 5° bis auf 70° erhitzt, und so lange auf dieser Temperatur gehalten, bis alles verzuckert ist (Jodprobe vgl. S. 35, Note 4). Filtrat mit Soda neutralisiert (Lackmuspapier)	wie zuvor	etwa 6	wie zuvor
3	Melassewürze	100 g Melasse mit 1 l Wasser und 20 g Malzkeimen 1/4 Stunde gekocht, mit n-H ₂ SO ₄ neutralisiert, filtriert, mit 3 g Superphosphat versetzt, 1/4 Stunde gekocht, nochmals neutralisiert, auf 8° Bllg. verdünnt	wie zuvor	6,8 bis 7	Schimmelpilze, Hefen u. a., z. B. Endomyces vernalis (Endomyconsis vernalis)
4	Gekläarte Melasselösung	100 g Melasse, 1 g Carboraffin, 1 g Kieselerde, 2 ccm 5 n H ₂ SO ₄ innig vermischt, mit 300 ccm Leitungswasser verdünnt, 1 Stunde am Rührwerk bei 65° gehalten, dann kurz aufgekocht, heiß durch ein Asbestfilter gesaugt, mit heißem Wasser nachgewaschen; auf 10° Bllg. verdünnt (Zuckergehalt etwa 6°/o) ²	wie zuvor	5,6	Hefen, Pilze

¹ Vornahme der Verdünnung: will man 500 g Bierwürze von 8° Bllg. aus einer Würze von z. B. 120 Bllg. herstellen, so verwendet man dazu 333 g (8 × 500/12) dieser Würze und setzt die fehlende Menge an Wasser zu (also 167 ccm). Herstellung von Bierwürze (nach MEYER: Praktikum der bot. Bakterienkunde, Jena, 1903): 250 g Darrrmalz geschrotet und gestoßen, mit 1 l Wasser 1 Stunde bei 60—65° gehalten; man kühlt dann und kocht gelinde zum Ausfällen der Eiweißstoffe. Vgl. auch Nährsubstrat Nr. 2.

² Nach BRAUN und PFUNDT: Bio. Z. 287, 115 (1936).

Tabelle IV.

Nr.	Art des Nährsubstrates	Herstellungsweise	Sterilisation	pH	Verwendungszweck
5	Hefewasser (Extrakt)	1 Teil Preßhefe mit 10 Teilen Wasser im Dampftopf 2—3 Stunden erhitzt, mit 0,1 Teil Bolus alba (oder Kieselgur) versetzt, aufgeköcht, abgeseigt, mit gewünschter C-Quelle versetzt (z. B. 2—5% Glucose), oder nach dem Erhitzen erkalten gelassen und zentrifugiert ¹	1 Std. im Dampftopf, nach dem Abfüllen 3mal je 30 Min.	6,4	Essigbakterien, zur Herstellung von Massenkulturen usw.
6	Hefesaft (Autolysat)	Preßhefe oder ausgewaschene und abgepreßte Bierhefe in eine Flasche eingestampft, verschlossen, bei 50° bis zur völligen Verflüssigung stehen gelassen; weitere Aufarbeitung wie zuvor ²	3mal im Dampftopf je 30 Min.	6,2 bis 6,4	Bakterien
7	Roggensuppe	5—6% Roggenmehl ³ und 1% Kreide in Wasser gut angerührt, aufgeköcht	im Autoklav	6,8	für Milchsäure-Coli-, Butter-säurebakterien, Heubacillen usw.
8	Getreidemaische	250 g Roggenschrot in 500 ccm Wasser angerührt, auf 45° erwärmt, 250 g Darmmalzschrot unter ständigem Rühren allmählich eingetragen; sodann ½ Stunde auf 45°, innerhalb ½ Stunde auf 60—65°, 1 Stunde so belassen ⁴ ; mit Wasser nach Wunsch verdünnt ⁵ . Flüssigkeit abgossen, Treber entfernt	wie bei 1, schließlich noch im Autoklav		
9	Getreideschrot-aufschwemmung	6 Teile fein geschrotetes Korn (oder Mais usw.) in 100 Teilen Leitungswasser gut verteilt ⁶	2—3 mal fraktioniert im Autoklav	6—6,2	butylogene Bakterien

10	Fleisch-Pepton-Wasser	1 Teil Liebigs Fleischextrakt in 100 Teilen Wasser gelöst, etwas davon mit 1 Teil Pepton (Witte) angerührt, hinzugefügt, mit n-NaOH neutralisiert (Lackmus) ⁷ ; $\frac{1}{2}$ -1 Stunde im Dampftopf erhitzt, mit n-Sodalösung schwach alkalisch gemacht; gegebenenfalls Klärung	1 Std. im Dampftopf, nach dem Abfüllen 3 mal je 30 Min.	7,2 bis 7,4	Bakterien, zur Herstellung von Massenkulturen usw.
11	Fleischwasser	500 g fettfreies Rind- oder Pferdefleisch durch die Fleischmaschine getrieben, mit 1 l Wasser 24 Stunden im Eisschrank oder $\frac{1}{2}$ Stunde bei 50° stehen gelassen. Saft durch ein Tuch gründlich ausgepresst, 1 Stunde gekocht ⁸ , durch ein Faltenfilter filtriert und auf 1 l aufgefüllt. Weitere Behandlung wie zuvor ⁹ .	wie zuvor	7 bis 7,4	wie zuvor
12	Henneberg-Nährboden	2,5% Roggenschrot, 1% Pepton, 2% Hefeautolyolat (unverdünnt), 1% Glucose, $\frac{1}{2}$ % Milchsücker, 2% CaCO ₃ ; $\frac{1}{2}$ Stunde kochen, abfüllen	3 mal im Dampftopf, 2 mal im Autoklav (2 at) ¹⁰	6,8	Milchsäure- u. Propionsäurebakterien, butylogene Bakterien

¹ Statt den Hefeextrakt selbst herzustellen, kann mit Vorteil auch das käufliche pulverisierte „Difco“ verwendet werden (in 0,3–0,6%iger Lösung, entsprechend einem Hefeextrakt von 1:20–1:10).

² Durch den Wasserzusatz nach der Autolyse stellt man z. B. auf 1:5, 1:10 oder 1:20 ein.

³ Hergestellt unter Verwendung der ganzen Körner, so daß also auch alle Klebersubstanzen vorhanden sind.

⁴ Prüfung auf Stärke mit Jodlösung; sobald nach dem Abkühlen der Probe mit Jod keine Blaufärbung mehr eintritt, ist die Verzuckerung vollständig.

⁵ Für Buttersäure- und Colibakterien usw. auf 8–10° Billg., für Milchsäurebakterien auf 15° Billg. verdünnt.

⁶ Bei Anwendung größerer Mengen wird das Kornschrot allmählich mit der betreffenden Wassermenge angerührt, so daß keine Klumpen entstehen, und dann erst sterilisiert.

⁷ Alkalische Reaktion ist zu vermeiden, um schwer entfernbaren Trübungen vorzubeugen.

⁸ Zur Fällung von Eiweiß, da sonst beim Sterilisieren Abscheidungen eintreten. Pro Liter Flüssigkeit

⁹ 1 Stunde Kochdauer.

¹⁰ Besonders bei empfindlichen Bakterien ist das frisch bereitete Fleischwasser geeigneter als der käufliche Fleischextrakt.

Nach der ersten Sterilisation im Autoklaven läßt man zum Auskeimen von Sporen 3–4 Stunden bei 35° stehen.

Tabelle V.

Nr.	Art des Nährsubstrates	Herstellungsweise	Sterilisation	pH	Verwendungszweck
13	Würze-Agar	Bierwürze wie bei Nr. 1 hergestellt, sterilisiert, mit 3% Agar versetzt, nach dem Quellen eine Stunde im Dampftopf erhitzt, filtriert	3 mal im Dampftopf, 2 mal im Autoklav (2 at)	5,6 bis 5,8	Schimmelpilze, Hefen
14	Würzegeatine	Würze von 8° Billg. mit 15% Gelatine versetzt, bis zur Lösung erhitzt, mit n-NaOH oder Soda gegen Lackmus neutralisiert, auf 30° abgekühlt, geschlagenes Eiweiß ¹ zugesetzt und bis zum Bruch im Wasserbad erhitzt (2–3 Stdn.); durch einen Warmwassertrichter filtriert und abgefüllt	2 mal fraktioniert im Dampftopf (je 1/2 Std.)	etwa 6	Schimmelpilze, Hefen
15	Würze-Kreide-Agar	Wie Nr. 13, nach dem Filtrieren mit 2% sterilem CaCO ₃ versetzt	wie Nr. 13	6,8–7	Schimmelpilze (säureempfindliche Rhizopusarten usw.)
16	Brot-nährboden	Klein geschnittenes, bei 80° getrocknetes Brot, zerbröselt und in Erlenmeyerkolben 1 cm hoch eingefüllt, gründlich mit Wasser befeuchtet	4 mal fraktioniert 1/2–1 Std.		Schimmelpilze
17	Reisnährboden	Grob geschroteter Reis wie zuvor weiter behandelt	wie zuvor	6,2 bis 6,4	Schimmelpilze

¹ Ein Eiweiß auf 2 Liter Lösung.

a) Sterilisieren durch Hitze. *a) Sterilisation durch trockene Wärme: Ausglühen*, insbesondere angewendet bei der Entkeimung von Impfgeräten (Platinnadeln, Skalpelle, Scheren, Pinzetten, Glasstäbe usw.); *Abflambieren* der Gefäßränder (von Proberöhren, Kolben usw.) sowie von Watte vor dem Impfen. *Heißluftsterilisation* (in Trockenschränken oder besonderen Heißluftsterilisatoren), etwa 1—2 Stunden bei 150—180°, Anwendung bei größeren Glasgefäßen und Geräten, bei nicht gelöteten Metallgegenständen, ferner bei Watte oder Filtrierpapier (nicht über 160°), oder bei festen Substanzen (wie z. B. Calciumcarbonat usw.).

β) Sterilisation durch Wasserdampf, und zwar entweder im strömenden Dampf (im Kochschen Dampftopf oder Dampfsterilisator) oder unter Druck (im Autoklav). Anwendung zur Sterilisation von Nährsubstraten, aber auch von Glas- und Metallröhren usw. Gummischläuche werden am besten durch längeres Auskochen in 1%iger Sodalösung keimfrei gemacht.

Dampftopf: Einmaliges Erhitzen reicht in der Regel nicht aus, daher wird zumeist fraktionierte (diskontinuierliche) Sterilisation angewendet: drei bis viermaliges Erhitzen (bei kleineren Mengen 15—20 Minuten, bei größeren 30—50 Minuten) in Intervallen von 12—14 Stunden; dabei werden nur die vegetativen Formen der Organismen abgetötet; in der Zwischenzeit werden die Substrate unter Bedingungen gehalten, die ein Auskeimen der eventuell vorhandenen Sporen begünstigen (wenigstens einige Stunden im Brutschrank).

Autoklav: Meist genügt ein einmaliges Erhitzen, und zwar bei $\frac{1}{2}$ Atm. Überdruck (= 112°) etwa 1 $\frac{1}{2}$ Stunden, bei 1 Atm. (120°) $\frac{1}{2}$ Stunde und bei 2 Atm. (134°) 10 Minuten. Ist zum Sterilisieren mancher Nährsubstrate (wie z. B. Kornmaische usw.) unbedingt erforderlich. Bei besonders resistenten Organismen (bzw. Sporen) fraktioniert anzuwenden. Niemals anzuwenden bei Gelatinenährböden; auch bei Peptonährböden nur mit Vorsicht anwendbar (Handhabung des Autoklaven vgl. Anhang I 3 b).

Ein längeres Erhitzen (etwa 2—3 Stunden) ist für die meisten Substrate sehr ungünstig. Auf derartigen Nährböden findet manchmal überhaupt kein Wachstum mehr statt. Die vorgeschriebenen Sterilisationszeiten sind daher stets genau einzuhalten. — Vielfach ist das getrennte Sterilisieren gewisser Bestandteile von Nährlösungen zu empfehlen (vgl. Übung 23 a). Zu beachten ist ferner, daß viele Di- und Polysaccharide beim Sterilisieren (vor allem unter Druck oder in sauren Lösungen) eine Hydrolyse erleiden.

b) Mikrobenfiltration. *a) Filtration von Luft und Gasen.* Verschuß von Gefäßen mit Wattedropfen (nicht entfettet, trocken); Durchleiten von Gasen durch einen erweiterten Rohr-

Tabelle VI.

Nr.	Art des Nährsubstrates	Herstellungsweise	Sterilisation	pH	Verwendungszweck
18	Molke- Peptonagar	1 l entrahmte Milch in einem Wasserbad bei 35° mit 2–3 Messerspitzen Labpulver versetzt, gut umgerührt, etwa 2 Stunden erwärmt (bis zur Abscheidung des Gerinnsels), sodann auf 80° erwärmt, filtriert, 10 g Pepton, 5 g NaCl und 15 g Agar zugefügt, 1–2 Stunden im Dampftopf erhitzt, eventuell filtriert	fraktioniert im Dampftopf 3 mal je 1/2 Std.	5,8	Milchsäure-, Propionsäure- bakterien usw.
19	Milchserum- Kreide-Agar	1 l kochende Milch mit der erforderlichen Menge verdünnter H ₂ SO ₄ versetzt (bis zur völligen Caseinfällung), filtriert, mit CaCO ₃ neutralisiert, noch 10–20 g Kreide und 15 g Agar zugefügt, 1–2 Stunden im Dampftopf erhitzt	wie zuvor	6,8–7	wie zuvor
20	Kartoffel- nährboden	Reinigung (mit Bürste unter der Wasserleitung), Entfernung der Augen und schadhafte Stellen, Einlegen in 0,1%ige Sublimatlösung (1 Stunde), gründlich abspülen, Verwendung von Keilen oder Scheiben!	3–4 mal fraktioniert je 30 Min.	6–6,2	Butylogene Bakterien usw.

21	Maiswürze- Agar ²	50 g Maismehl in 1 l dest. Wasser 2 Stunden im Autoklav (1,5 atü) erhitzt. Auf 60° gekühlt, 50 g Malzextrakt zugesetzt und 30 Min. bei 60° gehalten. 1 Stunde im Dampftopf erhitzt, durch Musselein filtriert, auf pH 6,5 eingestellt, 15 g Agar hinzugefügt, mittels Eiklar geklärt, filtriert	3mal im Dampftopf je 1 Std.	6,5	Essigbakterien
22	Nährgelatine	1 % Liebig's Fleischextrakt, 1 % Pepton in Wasser gelöst, mit 10—14 % Gelatine versetzt, nach dem Aufquellen auf 40—50° erwärmt (Wasserbad), im übrigen wie bei Nr. 10 weiter verfahren, sodann filtriert und eventuell geklärt ³	wie bei Nährsubstrat Nr. 10 ⁴	7,2 bis 7,4	für Bakterien, u. zw. vor allem für diagnostische Zwecke und Reinzüchtungen in Platten-, Strich- und Schüttelkulturen
23	Nähragar	1 % Liebig's Fleischextrakt, 1 % Pepton in Wasser gelöst, 1 Stunde im Dampftopf erhitzt, filtriert, 1 ½—2 ½ % Agar zugesetzt, über Nacht quellen gelassen, 1 Stunde im Dampftopf erhitzt, im übrigen wie bei 4 und 11 weiter behandelt	wie bei Nährsubstrat Nr. 10	7,2 bis 7,4	

¹ Z. B. Zylinder mittels eines Korkbohrers ausgestochen und in Proberöhrchen auf eine mit Wasser gut durchfeuchtete Watterschicht gebracht.

² Privatmitteilung von Dr. K. R. BUTLIN (Cambridge).

³ Zu beachten ist noch, daß Erhitzen über 50° vor der Alkalisierung unbedingt zu vermeiden ist.

⁴ Das Erhitzen darf nicht zu lange ausgedehnt werden, da sonst das Erstarrungsvermögen leidet; Erhitzen im Autoklav ist unbedingt zu vermeiden.

Tabelle VII.

N ^o	Bezeichnung (nach)	Zusammensetzung (g in 1000 cem)					Wasser	PH	Verwendungs- zweck
		C-Quelle	N-Quelle	P- und K- Quelle	Mg- und Ca-Quelle	Sonstige Stoffe			
24	MEYER	nach Bedarf	1 KH ₂ PO ₄	0,1 CaCl ₂ 0,3 MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 NaCl 0,01 FeCl ₃	dest. W.			
25	KNOP	nach Bedarf	1 Ca(NO ₃) ₂	0,25 KH ₂ PO ₄	0,25 MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,12 KCl Spur FeCl ₃ ¹	dest. W.		
26	USCHINSKY	35 Glycerin, 6—7 Ammonlactat, 3—4 asparaginsaures Na		2,5 KH ₂ PO ₄	0,1 CaCl ₂ 0,2—0,4 MgSO ₄ · 7H ₂ O	6 NaCl	dest. W.		
27	BREDEMANN	20 Rohrzucker 10 Asparagin ²		1 KH ₂ PO ₄	0,1 CaCl ₂ 0,3 MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 NaCl, 0,01 FeCl ₃ 16 Agar ³	Leitungs- wasser	6	
28	HENNEBERG	20 Ca-Lactat	20 Pepton ⁴	2 K ₂ HPO ₄	—	5 NaCl	Leitungs- wasser	5,8	
29	HENNEBERG	30 Glucose 40 Alkohol	10 Pepton	1 K ₂ HPO ₄ 1 CaHPO ₄	MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 Essigsäure	dest. W.		
30	BERNHAEUER- GÖRLICH	50 Glucose	2 (NH ₄) ₂ HPO ₄	1 KH ₂ PO ₄	0,25 MgSO ₄ · 7H ₂ O	Hefe- extrakt ⁵	Leitungs- wasser	6,8	

für Bakterien

für
Sporen-
nachweisPropion-
säure-
bakterienEssig-
bakterienEssig-
bakterien⁶

31	HAYDUCK	100 Rohr- zucker	2,5 Asparagin	1 KH_2PO_4	3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	Leitungs- wasser	5,8—6		
32	HENNEBERG	150 Rohr- zucker	2 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_4$	2 KH_2PO_4	1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 CaCO_3 (od. Na_2CO_3)	dest. W.	7,6	für Hefen	
33	HENNEBERG	150 Rohr- zucker	3 Asparagin	5 KH_2PO_4	2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 CaCO_3 (od. Na_2CO_3)	dest. W.	7	für Hefen	
34	HENNEBERG	150 Rohr- zucker	5 Pepton	5 KH_2PO_4	2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 CaCO_3 (od. Na_2CO_3)	dest. W.	7	für Hefen	
35	WÖLTJE	75 Rohr- zucker	10 Asparagin	5 KH_2PO_4	2,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	dest. W.	5,8	Peni- cillien	
36	HENNEBERG	100 Glucose	10 Pepton, 2 2 KNO_3	2 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_4$	0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 CaCl_2	dest. W.	6	für Schimmelpilze	
37	HENNEBERG	100 Rohr- zucker	2 KNO_3	1 KH_2PO_4	0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 CaCl_2	dest. W.	4,4-4,6		
38	CZAPEK-DOX	50 Glucose	2 NaNO_3	1 KH_2PO_4	0,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 KCl 0,01 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Leitungs- wasser	4,4-4,6	Peni- cillien	

¹ 2 Tropfen einer 1%igen Lösung.

² C- und N-Quelle in 11 Wasser gelöst, sodann Agar und nach dem Filtrieren die Salze hinzugefügt.

³ Verwendung von gewässertem, N-armem Agar: käuflicher Agar wird klein geschnitten und 3 Tage lang in fließendem Leitungswasser ausgelaut, dann bei täglichem Wasserwechsel während 8 Tagen unter dest. Wasser liegen gelassen. N-Gehalt beträgt sodann 0,25%.

⁴ An Stelle von Pepton kann auch ein Auszug aus peptisiertem Kasein verwendet werden. Vgl. MARGOLENA u. HANSEN: C. Bact. II 99, 107 (1938).

⁵ Und zwar die 1% Hefe entsprechende Menge.

⁶ Auch für empfindliche Bakterien geeignet; vgl. BERNHAUER und GÖRLICH, Bio. Z. 280, 367 (1935).

teil, der Watte oder Asbest enthält (vor Benutzung samt Gummiverbindungen im Dampf sterilisiert).

β) *Filtration von Flüssigkeiten*; insbesondere dann anzuwenden, wenn das betreffende Substrat kein Erhitzen verträgt (z. B. auch bei Enzymlösungen usw.). Benützung von *Hartfiltern*, z. B. in Form von Kerzen, die mit sterilen Saugkolben verbunden werden usw.; z. B. CHAMBERLAND-Kerzen (aus hart gebrannter Porzellanerde), BERKEFELD-Kerzen (aus Kieselgur mit etwas Porzellanerde), PUKALL-Filter (Kaolin-Quarz-Mischung; für große Flüssigkeitsmengen angewendet). Glassinterfilter (SCHOTT u. Gen.). *Weichfilter*: Filterscheiben aus Asbest; hierher gehören auch die bekannten SEITZ-Filter, die vor allem zur Entkeimung von Wein usw. verwendet werden. Ferner werden Weichfilter auch aus Kieselgur oder Kreide usw. angefertigt. *Ultrafilter*: kolloide Filtermaterialien, Membranfilter usw. Bei allen derartigen Filtern ist darauf zu achten, daß sie nur etwa 1 bis etwa 3 Tage sicher wirken, sodann durchdringen die Bakterien meist bereits die Filterporen (Durchwachsung der Filter); es muß dann steriles Wasser oder NaCl-Lösung in umgekehrter Richtung durch die Filter hindurchgesaugt werden (ebenso vor dem erstmaligen Gebrauch derselben).

e) *Chemische Sterilisationsmethoden*. Anwendung verschiedener keimtötender Chemikalien, falls Abtötung durch Hitze nicht möglich ist; also z. B. beim Sterilisieren dickwandiger Glasgefäße, die ein Erhitzen nicht zulassen, oder für verschiedene Sonderzwecke wie Desinfizieren von Arbeitstischen, sterilen Kammern, Impfkästen usw.

Sublimat in 0,1%iger Lösung (unter Zusatz von NaCl, zur Erhöhung der Löslichkeit), vorsichtshalber mit Fuchsin oder Eosin angefärbt; zur Desinfektion der Hände, feuchter Kammern, der Arbeitstische, Abtötung ausgemusterter Kulturen usw.

Äthylalkohol, in 50—70%iger Lösung, zur Desinfektion von verschiedenen Glasgeräten, Gummischläuchen, Arbeitstischen usw.

Formaldehyd, in Gasform zur Desinfektion von Räumen (Gärkammern, Thermostaten, sterilen Räumen, Impfkästen usw.); als Lösung (5 ccm Formol auf 1 l Wasser) für Glasgeräte usw. (ebenso 3%iges Lysol).

Schwefeldioxyd, in Gasform zur Desinfektion von Räumen (wie zuvor).

Montaninlösung zur Sterilisierung von Geräten, Arbeitstischen, Wänden in Gärkammern usw.

Zephirollösung (J. G. Farben A. G.). Verwendung wie zuvor.

Chloroform und *Toluol*, als Zusätze (1—2%) zu enzym-chemischen Versuchslösungen oder um bereits absterilisierte Kulturlösungen (z. B. manche ausgegorene Flüssigkeiten) für längere Zeit keimfrei zu halten (z. B. wenn keine sofortige Aufarbeitung erfolgen kann).

B. Methoden zur Züchtung und Charakterisierung der Gärungsorganismen.

Im folgenden werden zunächst die Reinzüchtungsmethoden behandelt, und zwar die Gewinnung von Gärungsorganismen aus der Natur sowie die Isolierung und Reinzüchtung derselben, und sodann die Fortzüchtung der Gärungsorganismen im Laboratorium, wobei insbesondere die Verfahren zur Erhaltung des Gärvermögens von größter Bedeutung sind; schließlich wird noch auf die wichtigsten mikroskopischen Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung der Mikroorganismen hingewiesen.

1. Reinzüchtungsmethoden und das Herauszüchten von Gärungsorganismen aus natürlichen Substraten.

a) Auffindung von Gärungsorganismen in der Natur. *Vorkommen der Gärungsorganismen* in der Natur sehr verschieden, je nach den ernährungsphysiologischen Bedürfnissen derselben; Art der Organismen insbesondere vom p_H und den Nährstoffen des Substrates abhängig, ferner von der Temperatur sowie ob aerobe oder anaerobe Verhältnisse vorhanden sind. Hinsichtlich des Vorkommens der verschiedenen Gärungsorganismen in der Natur vgl. S. 57 ff.¹; eine Anzahl von Substraten, die zur Gewinnung von Gärungserregern geeignet erscheinen und die auf denselben vorkommenden Mikroorganismen sind in Tab. VIII wiedergegeben.

Gewinnung von Mikroorganismen aus natürlichen Substraten. Man geht entweder direkt von in der Natur gesammelten, infizierten Substraten aus oder man geht so vor, daß geeignete Substrate (entweder Naturstoffe oder Nährböden) im Laboratorium (z. B. an Fensterplätzen oder in Kellerräumen oder an anderen feuchten Orten usw.) stehen gelassen und nun nach einiger Zeit Proben untersucht werden. Vorgang: Abimpfen einer Anzahl Proben von den infizierten Substraten auf verschiedene für die betreffenden Organismen geeignete Nährböden; weitere Untersuchung mikroskopisch, nachdem Entwicklung

¹ Bezüglich Vorkommen und Verbreitung von Bodenpilzen vgl. NIETHAMMER: Die mikroskopischen Bodenpilze, 'S-GRAVENHAGE, W. JUNK, 1937.

Tabelle VIII.

Substrate	Mikroorganismen
Obstfrüchte (Weinbeeren, Kirschen, Pflaumen, Äpfel, Birnen usw.)	Weinhefen, wilde Hefen, wilde Essig- bakterien, Penicilliumarten, Rhizopus- arten, Aspergillusarten
Citronen, Apfelsinen . .	Penicilliumarten (Citromyces)
Wein (Bodensatz)	Weinhefen
Weinreste	Weinessigbakterien, Kahlmhefen, wilde Essigbakterien
Bier (Bodensatz)	Bierhefen, Pediokokken
Trübes Bier, Bierreste .	Milchsäurebakterien, Kahlmhefen, wilde Essigbakterien
Sauerteig	Wilde Hefen, wilde Milchsäurebakterien, wilde Essigbakterien, Oidien
Bäckerhefe	Preßhefe, wilde Hefen, Kahlmhefen, Exi- guushefen, wilde Milchsäurebakterien, Oidien
Saure Gurken	Kahlmhefen, wilde Milchsäurebakterien
Sauerkohl	Wilde Hefen, Kahlmhefen, wilde Milch- säurebakterien
Sauerfutter (Silage) . .	Wilde Hefen, Kahlmhefen, wilde Milch- säurebakterien, Bact. coli
Heu	Heubacillen, butylogene Bakterien
Grünmalz	Milchsäurebacillen, wilde Milchsäure- bakterien, Penicilliumarten
Darmmalz	Heubacillen, Pediokokken, Mucorarten
Getreideschrot	Milchsäurebacillen, wilde Milchsäurebak- terien, Sarcinen, Heubacillen, butylo- gene Bakterien
Kartoffeln	Wilde Milchsäurebakterien, butylogene Bakterien
Saure Milch	Milchsäurebakterien, Oidium lactis
Butter	Milchsäurebakterien
Käse	Milchsäurebakterien, Propionsäure- bakterien
Käserinde	Penicilliumarten
Brot	Penicilliumarten, Aspergillusarten, Mucor- arten, Bac. mesentericus
Essig	Schnellessigbakterien, Weinessigbakterien, Schleimessigbakterien
Zuckerrübe	Butylogene Bakterien
Erde	Heubacillen, butylogene Bakterien
Schlamm	Cellulosevergärer, Methanbakterien
Exkremente	Biersarcine, Bact. coli, Cellulosevergärer, Mucorarten

stattgefunden hat (vgl. S. 54 ff.). Schließliche Gewinnung der gewünschten Formen mit Hilfe der Reinzüchtungsmethoden.

b) Reinzüchtungsmethoden (Isolierung einzelner Organismen). Auf natürlichen Substraten tritt meist eine sehr große Anzahl verschiedener Organismen auf. Aufgabe der Reinzüchtungsmethoden ist es nun, aus derartigen Gemischen von Organismen einzelne Individuen zu isolieren und so „reinzuzüchten“.

Unterscheidung von zwei Reinzüchtungsmethoden, nämlich: Methode der natürlichen Reinzucht¹ und Methode der absoluten Reinzucht; im ersten Falle geht man von einem Organismengemisch aus und sucht aus diesem durch Wahl geeigneter Wachstumsbedingungen die gewünschten Organismen zum Überwiegen zu bringen (Anreicherungsverfahren), im zweiten Falle sucht man von einer einzigen Zelle auszugehen (Ein-zellkultur).

a) Methode der natürlichen Reinzucht. Prinzip: Wahl geeigneter Außenbedingungen für die Fortentwicklung der gewünschten Organismen, und zwar: optimale Temperatur, Anwendung aerober oder anaerober Bedingungen, Einstellung eines geeigneten p_H -Wertes, Auswahl des günstigsten Nährbodens; bei Sporenbildnern: Abtötung von nicht sporenbildenden Begleitorganismen durch Erhitzen (oder auch durch antisepische Mittel). Durch Wahl der geeignetsten Bedingungen erfolgt raschere Entwicklung der gewünschten Formen unter Zurückdrängung der Begleitorganismen²; wiederholte Überimpfungen unter analogen Bedingungen, bis nur noch die gewünschten Organismen vorhanden sind. Praktische Durchführung vgl. Übung 2 a.

Ergebnis der natürlichen Reinzucht: Es gelingt auf diese Weise meist nur zu einem Gemisch gleichartiger Organismen zu gelangen (z. B. verschiedener Hefen usw.), doch genügt dies vielfach für manche gärungsschemische Zwecke (bei manchen Gärungsvorgängen wird sogar vorteilhafterweise mit Organismengemischen gearbeitet; vgl. z. B. Buttersäuregärung).

β) Methode der absoluten Reinzucht. Prinzip: Räumliche Trennung der vorhandenen Keime insbesondere durch Verdünnungsverfahren, um zu einer einzigen Zelle zu gelangen. Verhinderung der Wiedervereinigung der getrennten Keime 1. durch Anwendung von Gallerten, in denen die einzelnen Keime räumlich fixiert werden (Kochsches Plattenverfahren) oder 2. durch Aufteilung der Keimsuspension auf kleinste Flüssigkeitströpfchen mit nur einer Zelle (Federstrichkultur und Tuscheplattverfahren). Ferner wählt man bei beiden Methoden gemäß dem Prinzip der natürlichen Reinzucht Bedingungen, die eine günstige Entwicklung der gewünschten Organismen ermöglichen. Weiterhin geht man

¹ Abgeleitet von der Tatsache, daß sich ein derartiger Reinzuchtvorgang vielfach auch in der Natur selbst abspielt.

² Hierher gehört auch die Unterstützung der natürlichen Reinzucht durch Zusatz geeigneter Salze („Ionenzuchtwahl“). Vgl. BOJANOVSKY, R.: C. Bact. II, 99, 55 (1938).

vorteilhafterweise von Rohkulturen aus, die bereits nach dem Anreicherungsverfahren gewonnen sind, und daher nur noch eine beschränkte Anzahl gleichartiger Organismen enthalten. Die im folgenden beschriebenen Verfahren müssen zumeist zur Erzielung von Reinkulturen in sinngemäßer Weise noch ein- bis zweimal wiederholt werden.

Das KOCHSche Plattenverfahren. Vorgang bei aeroben Organismen: Einige Platten des festen Nährbodens in PETRI-Schalen mit verschiedenen Verdünnungen der Rohkultur übergossen, Schale umgedreht, überschüssige Flüssigkeit ablaufen lassen (Ansammlung im Deckel, abgießen). PETRI-Schalen sodann in einer feuchten Kammer (s. S. 28) bei entsprechender Temperatur bis zur Entwicklung der Kolonien aufbewahren. Von der am besten gelungenen Platte (bei der nur wenige Einzelkolonien vorhanden sind) wird nach mikroskopischer Feststellung der Einheitlichkeit auf neuen Nährboden überimpft (am besten unter Zuhilfenahme eines binokularen Plattenmikroskopes).

Vorgang bei anaeroben Organismen. Einige Agar- (oder Gelatine-)röhrchen werden im Wasserbad aufgeschmolzen, mit einer Platinöse des verdünnten Materials versetzt (auch hier einige Proben mit verschiedenen Verdünnungen); Verteilung durch vorsichtiges Drehen des Röhrchens (unter Vermeidung von Luftblasen, die sonst später Kulturen vortäuschen könnten); sodann in sterile PETRI-Schalen ausgegossen. Platten in einem Anaerobenapparat (s. S. 49) aufbewahrt und wie zuvor weiter verfahren.

Federstrichkultur (Tröpfchenkultur). Prinzip: Anlegung der Kulturen nach Verdünnung des Ausgangsmaterials im Nährmedium an der Unterseite eines auf einen hohlen Objektträger aufgelegten Deckgläschens. Durchführung der Operation am besten in einem sterilen Raum (Impfkasten).

Vorgang bei der Anfertigung der Federstrichkultur: Das Ausgangsmaterial wird entsprechend verdünnt (vgl. S. 89), der Objektträger und das Deckgläschen durch Abflambieren sterilisiert, der Hohlraum am Objektträger wird mittels eines Pinsels mit einem Ring, bestehend aus einer Mischung von Vaseline und Paraffinöl, umgeben und das Deckgläschen quer aufgelegt. Sodann wird es wieder abgenommen und auf demselben die verdünnte Organismensuspension mittels einer Zeichenfeder (sterilisiert durch Befeuchten mit Alkohol und entzünden) in Form von vier bis sechs kleinen Strichen in drei bis vier Reihen aufgetragen. Man hält dabei das Deckgläschen an zwei entgegengesetzten Ecken. Sodann wird es wieder auf die Höhlung des Objektträgers quer aufgelegt (nachdem man in die Höhlung hineingehaucht hat). Man stellt mikroskopisch fest, welche der Tröpfchen bloß eine Zelle enthalten und bezeichnet diese in zweckmäßiger Weise¹. Falls keines der Tröpfchen nur eine Zelle enthält, muß noch stärker verdünnt werden. Sodann wird das Deckgläschen mit einem Vaseline-

¹ An der rechten Seite des Objektträgers klebt man ein kleines Schildchen an und markiert in Form kleiner Striche die einzelnen Tröpfchen im Präparat. Tröpfchen, die nur eine Zelle enthalten, werden am Schild durch Durchkreuzen des zugehörigen Striches gekennzeichnet.

ring umzogen und das Präparat bei geeigneter Temperatur aufbewahrt. Nach 24 Stunden erfolgt die mikroskopische Prüfung der bezeichneten Tröpfchen auf Reinheit und Einheitlichkeit. Abimpfen geeigneter Kulturen mittels eines sterilen Filtrierpapierstückchens unter Zuhilfenahme einer Pinzette, Einwerfen desselben in die sterile Nährlösung.

Bei anaeroben Organismen (nach NIKIFOROFF): Im Prinzip analog, doch wird in den Hohlraum des Objektträgers je 1 Tropfen Kalilauge und Pyrogallolösung gebracht¹, sodann wird das Deckgläschen mit Vaseline abgeschlossen und die am Objektträger befindlichen Tropfen werden durch Neigen vereinigt.

Tuschepunktverfahren (nach BURRI). Verdünnung der Mikroben-suspension mit Hilfe flüssiger Tusche; ermöglicht eine einfache Kontrolle, da sich die hellen Bakterienzellen vom dunklen Untergrund klar abheben. Vorgang: 1 Teil Pelikantusche (Nr. 541, GRÜBLER, Leipzig) und 9 Teile destilliertes Wasser in Proberöhrchen zu je 10 cem im Autoklaven sterilisiert, 10—14 Tage stehen gelassen (Absetzen größerer Teile); auf einen sterilen entfetteten² Objektträger mit einer großen sterilen Platinöse 4—5 Tropfen der Tusche aufgetragen (von der Oberfläche entnommen). Vom Ausgangsmaterial ein wenig in den Tropfen 1 gebracht, von diesem mittels einer kleineren Platinöse in den Tropfen 2 usw. Vom vierten oder fünften Tropfen zeichnet man mit einer sterilen Tuschfeder auf eine feste Gelatineplatte mehrere winzige Punkte (Feder flachaufsetzen, um Verletzung der Oberfläche zu vermeiden) und bedeckt sie mit einem Deckgläschen. Untersuchung des Präparates mit einer starken Trockenlinse; Tröpfchen mit nur einer Zelle werden auf der Unterseite der Platte bezeichnet. Kolonieentwicklung im Thermostaten; Abimpfen nach Abheben des Deckgläschens von den bezeichneten Tröpfchen in eine geeignete Nährlösung. — Neuerdings werden Cellophanplättchen zur Anlegung von Einsporenkulturen empfohlen³.

2. Allgemeine Kulturmethoden zur Fortzüchtung der Gärungsorganismen.

(Erhaltung der Stammkulturen.)

Die Fortzüchtung der Organismen hat im gegebenen Rahmen den Zweck, dieselben für gärungsschemische Untersuchungen jederzeit bereit zu haben; die betreffenden Organismen werden dabei zeitweise auf geeignete Nährsubstrate überimpft und, nachdem sie zur Entwicklung gelangt sind, aufbewahrt. Verschiedene Methoden, je nachdem ob es sich um aerobe oder anaerobe Organismen handelt. Sodann dient diese weitere Kultivierung auch zur Identifizierung rein gezüchteter Organismen. Betont sei gleich hier, daß die im Rahmen der Fortzüchtung aufbewahrten Kulturen niemals für gärungsschemische Versuche direkt verwendet werden dürfen, sondern erst nach der Anlegung von besonderen Impfkulturen, mit denen dann erst die Gärsubstrate geimpft werden. Organismen, die längere Zeit nicht überimpft worden waren, müssen

¹ Vgl. S. 49, Note 1.

² Vgl. S. 54, Note 1.

³ GALLOWAY: Analyst **62**, 455 (1937).

unbedingt vor der weiteren Benützung mehrmals auf frische Nährböden übertragen werden. Dies gilt vor allem für Kulturen aus Sammlungen.

a) Aerobenkultur. *Kulturen in flüssigen Nährsubstraten*; meist in kleinen Kölbchen (FREUDENREICH- oder HANSEN-Kölbchen) oder Fläschchen. Beimpfung derselben, indem das Keimmaterial mit der Platinöse zunächst an der Glaswand verrieben und sodann in die Nährlösung hineingespült wird.

Kulturen auf festen Nährböden, insbesondere in Proberöhren auf Schrägagar (oder auch Gelatine). Beimpfung, indem das Keimmaterial mit der Platinöse an der Oberfläche verteilt wird (Ziehen eines geraden Striches oder einer Wellenlinie). Speziell zur Identifizierung und Charakterisierung von Mikroorganismen dient die Plattenkultur, die Riesenkoloniekultur nach LINDNER sowie die Tröpfchenkultur; analog wie bei den Reinzüchtungsmethoden (S. 45).

b) Anaerobenkultur. Kulturen in festen Nährsubstraten in hoher Schicht (einfachste Methode); Stichkultur (in Proberöhren): Beimpfung mittels eines Platindrahtes durch Einstechen desselben mit dem Keimmaterial in den Nährboden. Schüttelkultur (in Proberöhren): Nährboden im Wasserbad aufgeschmolzen, Keimmaterial eingetragen, durch vorsichtiges Drehen im Nährboden verteilt (luftblasenfrei), Nährboden dann in vertikaler Stellung erstarren gelassen. Sodann ist noch eine Anzahl spezieller Methoden zur Verdrängung bzw. Entfernung des Sauerstoffs zu unterscheiden¹, und zwar:

Kultivierung in indifferenten Gasatmosphäre. Am einfachsten in Kolben mit flüssigem Nährsubstrat, Einleitung von Stickstoff oder Wasserstoff nach dem Impfen unter sterilen Bedingungen, sodann mit Gäraufsatz oder mit Gummistöpsel verschließen (die Gase werden vor dem Einleiten noch einer besonderen Waschung unterzogen²) (vgl. auch Nachtrag).

Kultivierung im Vakuum. Ampullenförmige Gefäße (starkwandige Proberöhren, im oberen Drittel an einer Stelle stark verengt und ausgezogen), mit flüssigem Nährsubstrat gefüllt (etwa $\frac{1}{3}$ des Volumens), nach der Beimpfung auf 30–35° erwärmt (Wasserbad), evakuiert und dabei an der ausgezogenen Stelle zugeschmolzen.

Absorption von Sauerstoff. Benutzung besonderer Apparate zur Anaerobenkultur (vgl. z. B. Abb. 6). Die Kulturgefäße werden nach dem Impfen in den Apparat gebracht und derselbe verschlossen;

¹ Nach KLIGLER und GUGGENHEIM (J. Bact. **35**, 141; 1938) bewirken geringe Mengen Ascorbinsäure eine Erniedrigung des Redoxpotentials des Nährbodens und ermöglichen so eine Züchtung von Anaeroben auch in Gegenwart von Sauerstoff. Ob dies auch methodisch von Bedeutung sein kann, läßt sich noch nicht sagen.

² Wasserstoff wird durch eine gesättigte Kaliumpermanganatlösung geleitet, Stickstoff durch alkalische Pyrogallollösung.

zur Sauerstoffabsorption dient z. B. Pyrogallol-Kalilauge¹ (Pyrogallol-lösung im Apparat in einem Gefäß, Kalilauge nach der Beschickung einlaufen gelassen); nach dem Evakuieren im Brutraum aufgestellt. Die Entfernung des Sauerstoffs kann auch durch Veratmung desselben erfolgen; am besten durch Hafer, der in eine Schale am Boden des Apparates eingefüllt mit Wasser befeuchtet wird².

c) **Nährböden für die Fortzüchtung der Gärungsorganismen.** Man verwendet hier in der Regel natürliche Nährsubstrate (vgl. S. 33), vor allem in verfestigter Form (s. S. 36 u. 38), also als Agar- oder Gelatinröhrchen. Im folgenden sind noch die für die Hauptgruppen der Gärungsorganismen in Betracht kommenden Nährböden kurz zusammengefaßt:

Hefen: Bierwürzeagar; für spezielle Zwecke (oder besondere Hefen), Molkeagar, Melasseagar u. a.

Milchsäurebakterien: HENNEBERG-Nährboden, Malzwürze.

Propionsäurebakterien: Molke-Pepton-Agar.

Butylogene Bakterien: Getreideschrot-aufschwemmung, Erdkultur.

Essigbakterien: Bierwürzeagar, Maiswürzeagar, Bierwürze, Weinagar, Glucose-Hefewasser.

Schimmelpilze: Bierwürzeagar, Bierwürze-Kreide-Agar, Brot-Torf u. a.

d) **Allgemeine Maßnahmen und Einrichtungen zur Fortzüchtung.**

Zeitpunkt der Fortzüchtung: Im allgemeinen wird man damit auskommen, die Organismen etwa alle 4—5 Wochen auf neues Nährsubstrat zu überimpfen; bei besonders empfindlichen Formen entsprechend früher. Bei wenig empfindlichen Organismen (z. B. den meisten Pilzen oder sporenbildenden Bakterien) kann das Abimpfen auch erst nach etwa 4—6 Monaten vorgenommen werden; dabei geht man so vor, daß das zur Fortzüchtung dienende Röhrchen nach vollkommener Entwicklung der Kulturen mit Siegellack verschlossen oder zugeschmolzen wird (um ein Austrocknen oder Fremdinfektionen zu vermeiden). Zweckmäßigerweise legt man von jedem Organismus stets zwei Parallelkulturen

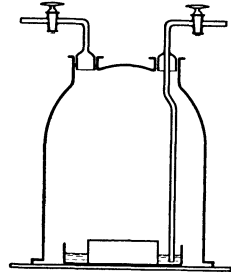


Abb. 6. Apparat zur Anaerobenzüchtung.

¹ Man verwendet die LIEBIGSche Pyrogallollösung (wie für gasanalytische Zwecke): 1 Volumteil 25%ige Pyrogallollösung und 5 bis 6 Teile konzentrierte Kalilauge (3:2); 1 ccm dieser Lösung absorbiert 12 ccm Sauerstoff. Bei CO₂-bedürftigen Organismen wird statt Kalilauge vorteilhafterweise konzentrierte Sodalösung verwendet.

² Privatmitteilung von Herrn Prof. Dr. W. H. PETERSON.

an, die erst dann verworfen werden, sobald die übernächste Impfung in Ordnung verlaufen war, so daß stets zwei Generationen aufbewahrt werden.

Aufbewahrung der Kulturen: An kühlen, staubfreien, dunklen Orten (Kulturschränke, vielfach auch Eiskasten), am besten und übersichtlichsten in Holzklötzen mit Löchern zur Aufnahme der Proberöhren oder Fläschchen.

Herstellung von Dauerkulturen. Z. B. von *Lactobacillus Delbrückii*: Eine Maischekultur wird 1 Tag bei 40° anwachsen gelassen und dann im Eisschrank aufbewahrt. Butylogene Bakterien: Kulturen in Getreidemaische oder Kartoffelmalsche läßt man 2 Tage bei 35—37° anwachsen und bewahrt sie dann im Eisschrank auf. Die Kulturen halten sich so einige Monate; zweckmäßigerweise werden sie etwa alle 1—2 Monate auf frisches Substrat gebracht. Noch günstiger scheint die Aufbewahrung in Form von Erdkulturen zu sein: Einimpfen der Bakteriensporen in eine sterile Suspension von Gartenerde (vgl. auch Übung 25 c).

3. Spezielle gärungschemische Kulturmethoden.

(Aufzüchtungen und Konstanterhaltung des Gärvermögens.)

Bei der Weiterzüchtung der Organismen, also der wiederholten Überimpfung derselben auf die im Laboratorium bereiteten Nährböden machen sich in der Regel allmählich gewisse Ermüdungserscheinungen („Krankheitserscheinungen“, Degenerationen) bemerkbar, indem die Mikroben nun schlechter gedeihen und besonders in ihrem gärungschemischen Verhalten Wandlungen zeigen (Abnahme der Gärkraft, auch qualitative Änderungen in der Bildung von Gärprodukten). Die Änderungen im physiologischen Verhalten können auch von morphologischen Veränderungen begleitet sein, doch muß dies nicht immer der Fall sein. Diese Erscheinung wurde als Variation, Mutation, Dissoziation usw. benannt. — Alle erblichen, also permanenten Veränderungen können als Mutationen¹ und alle nicht erblichen, also rückgängigen als Modifikationen bezeichnet werden.

Die Konstanthaltung des Wachstums- und Gärvermögens der Mikroorganismen ist daher eine der wichtigsten Aufgaben der biologischen Methodik der Gärungschemie. Dazu kommt ferner, daß viele Organismen an gewisse zu vergärende Substrate erst gewöhnt werden müssen. Ein weiteres Ziel ist die Auswahl der gärkräftigsten Keime auch innerhalb eines morphologisch einheitlichen Gärungserregers. Im folgenden werden die zur Lösung dieser Aufgaben in Frage kommenden Methoden besprochen.

¹ Vgl. die grundlegende Abhandlung von BEIJERINCK „Mutation bei Mikroben“ [Folia Microbiologica 1, 4 (1912)], derzufolge die bakterielle Veränderlichkeit (Bakterien-Dissoziation) auf eine Genmutation zurückzuführen sein soll. Vgl. auch LINDEGREN: C. Bact. II, 92, 40 (1935); 93, 113 (1936). — DESCOWITZ: J. Bact. 33, 349 (1937). — MAYER: Diss. Delft 1938.

a) Gewöhnung an Substrate. Man kann in zweifacher Weise vorgehen, und zwar: 1. Die Keime werden wiederholt auf das betreffende Substrat übertragen; dieselben gedeihen bei den ersten Überimpfungen noch schlecht und gewöhnen sich erst nach wiederholter weiterer Überimpfung an den Nährboden, bis sie schließlich auf demselben eine normale Entwicklung zeigen. 2. Überimpfung der Keime auf Mischungen des ursprünglichen Substrates (A) mit jenem Substrat, an das die Organismen gewöhnt werden sollen (B); bei den weiteren Überimpfungen läßt man das Substrat B allmählich überwiegen, bis es schließlich allein zur Anwendung kommt.

Die Substratgewöhnung ist vor allem für die Ausbildung jener Enzyme, die das betreffende Substrat anzugreifen vermögen, von größter Wichtigkeit. Dabei sind zwei Fälle zu unterscheiden, nämlich die rasche und die langsame enzymatische Adaption¹. Für uns ist hier vor allem der zweite Fall wichtig, also die allmähliche Gewöhnung der Organismen an gewisse Nährstoffe durch wiederholte Überimpfungen (vgl. oben).

a) Rasche enzymatische Adaptionen. Es konnte gezeigt werden¹, daß Milchsäurebakterien bestimmte Kohlehydrate (wie Galaktose, Arabinose, Maltose usw.) nur dann zu vergären vermögen, wenn sie vorher auf denselben gewachsen waren. Dagegen wurden andere Zucker (Glucose, Fruktose, Mannose, Rohrzucker), auf jeden Fall vergoren, unabhängig davon, auf welchem Substrat die Organismen zur Entwicklung kamen. Im ersten Fall handelt es sich um adaptive, im zweiten Fall um konstitutive Enzyme, die zur Bildung und Wirkung kommen¹. Es ist natürlich verschieden, welche Enzyme für einen Organismus konstitutive und welche adaptive sind. — So ist z. B. die Galaktose-Zymase der Hefe ein ausgesprochen adaptives Enzym und eine an Galaktose gewöhnte Hefe verliert die Galaktose-Zymase sogleich nach Vergärung von Glucose. — Ob es sich bei der Beeinflussung der adaptiven Enzyme durch die Substrate um eine Enzymbildung handelt, oder um eine Wirksammachung vorhandener, aber inaktiver Enzyme, läßt sich vorläufig noch nicht mit Sicherheit entscheiden.

β) Langsame enzymatische Adaptionen. Unter den physiologischen Eigenschaften der Mikroorganismen (besonders der Bakterien) sind drei Gruppen zu unterscheiden, und zwar solche, die immer vorhanden sind, solche die schwanken und solche, die niemals vorhanden sind. Während die erste und dritte Gruppe unbeeinflussbar ist², unterliegen die Eigenschaften der zweiten Gruppe Änderungen und sind daher auch durch Züchtungen beeinflussbar. Dieselben können z. B. verlorengehen oder latent vorhanden sein und durch

¹ Vgl. die Zusammenfassung von KARSTRÖM: Erg. d. Enzymforsch. 7, 350 (1938). — S. ferner Nachtrag.

² So gelang es z. B. KARSTRÖM (l. c.) durch 6 Jahre lange Züchtung eines gewissen Coli-Stammes nicht, denselben an die Vergärung von Rohrzucker zu gewöhnen.

geeignete Maßnahmen wieder auftreten¹ oder überhaupt neu entstehen.

Dabei wird die langsame enzymatische Adaption im allgemeinen durch zweierlei Vorgänge zustande kommen, nämlich: Zunächst werden auf Grund der Variabilität der Mikroorganismen, also durch Mutation bzw. Modifikation Keime (Varianten) entstehen, die die Enzyme zur Umsetzung des betreffenden Substrates zu produzieren vermögen². Sodann werden sich gerade diese Varianten auf dem betreffenden Substrat rascher entwickeln, da sie dasselbe besser umzusetzen vermögen, und so die anderen Keime auf Grund der „natürlichen Auswahl“ verdrängen³.

b) Substratwechsel. Auch hier sind zwei Möglichkeiten zu berücksichtigen, nämlich: 1. Die Organismen entwickeln sich auf irgend einem Substrat zu üppig (z. B. unter Verfettung, Zellvergrößerung usw.) unter gleichzeitiger Abnahme ihrer Gärkraft; dies wird vielfach auf Nährböden mit reichlichen Mengen natürlicher Nährstoffe der Fall sein. Man überimpft dann die Organismen auf nährstoffärmere Substrate (z. B. sogenannte Mineralsalzlösungen, eventuell in Mischung mit dem ursprünglichen Nährboden) und führt erforderlichenfalls zur Erhaltung des Gärvermögens Wechselüberimpfungen durch. 2. Die Organismen entwickeln sich auf einem synthetischen Nährboden zu schwach und ihre Gärkraft sinkt; man nimmt dann Überimpfungen auf ein natürliches Substrat vor (z. B. Kartoffeln, Erde, Früchte usw., je nach dem Fundort der betreffenden Organismen) und impft

¹ So erhielten wir z. B. einmal aus Sammlungen zwei Stämme von *A. dioxyaceticum*, die ihr Vermögen zur Bildung von Dioxyaceton aus Glycerin völlig eingebüßt hatten. Nach wiederholter Überimpfung derselben auf Glycerin enthaltenden Nährlösungen hatte das eine Bakterium sein Vermögen zur Dioxyacetonbildung wiedererlangt, das andere aber überhaupt nicht (KNOBLOCH: Diss. Prag 1938). — Andere Beispiele: Durch länger währende Züchtung von *S. Ludwigii* [HAEHN und GLAUBITZ: B. 60, 490 (1927); KAN IWASAKI: Bio. Z. 203, 237 (1928); LEHMANN: Bio. Z. 277, 261 (1935)] oder von *B. coli* [VIRATANEN, KARSTRÖM und TURPEINEN: H. 187, 7 (1930)] in Dioxyacetonlösungen gelingt es, die Gärungsgeschwindigkeit gegenüber diesem Substrat bei den genannten Organismen immer mehr zu steigern, während die gegenüber Traubenzucker gleich blieb oder etwas sank. — Oder: Steigerung des Oxydationsvermögens von *B. gluconicum* gegenüber Galaktose und Mannose, wobei mit anderen Essigbakterien kein Effekt eintrat [HERMANN und NEUSCHUL: Bio. Z. 270, 6 (1934); Bl. Soc. Biol. 18, 390 (1936)].

² Zusammenfassung der Literatur über die Variabilität von Bakterien auf Grund von Mutationen bzw. Modifikationen vgl. HADLEY: J. Infekt. Dis. 60, 129 (1937). Hinsichtlich der Verschiedenheit der Varianten bezüglich ihres Gärvermögens vgl. SHERMAN und HUSSONG: J. Dairy Sci 20, 101 (1937). — YAWGER und SHERMAN: ebenda 20, 83 (1937). — DULANEY und DEERE: J. Bact. 33, 19 (1937) u. a.

³ Vgl. dazu YUDKIN: Bioch. J. 26, 1859 (1932).

dann wieder auf die laboratoriumsmäßigen Nährböden. Vorgang gegebenenfalls des öfteren wiederholen.

c) **Fortlaufende Auswahl der gärkräftigsten Kulturen (Hochzüchtungen).** Schwankungen im Gärvermögen auch bei dem gleichen Gärungserreger sind biologisch bedingt; bei der weiteren Züchtung durch Überimpfung bleibt es dem Zufall überlassen, ob dabei gerade die besten Keime zur Weiterzüchtung gelangen. Um dies vom Zufall unabhängig zu machen und zugleich eine Auswahl der besten Kulturen zu treffen, geht man folgendermaßen vor: Von der Stammkultur (z. B. durch Reinzüchtung gewonnen oder aus einer Kultursammlung erhalten) wird eine Anzahl von Impfkulturen (8 bis 10) angelegt, von denen nun nur die beste für die weitere Impfung, also zur Fortzüchtung verwendet wird, wobei wieder in der gleichen Weise vorgegangen wird. Für die Auswahl der geeignetsten Kulturen sind, abhängig von der Art der Gärungserreger, verschiedene Gesichtspunkte maßgebend: z. B. makroskopisches Aussehen, Gärgeschwindigkeit (Messung der Gärgase), Verfolgung der Säurebildung durch Titration usw. Ferner kann man bei der Auswahl so vorgehen, daß gemäß den Reinzuchtmethoden eine Anzahl von einzelnen Zellen (vegetative Formen, Sporen oder Conidiosporen) entnommen und jede Zelle gesondert zur Entwicklung gebracht wird. Die geeignetsten Kulturen werden sodann ausgewählt und die anderen verworfen.

Anhang: Kulturmethoden zur Keimgehaltsbestimmung.

Auch bei gärungschemischen Untersuchungen ist es vielfach von Wichtigkeit, während des Gärprozesses oder in einem bestimmten Stadium desselben den Keimgehalt festzustellen. Dazu können neben den mikroskopischen Methoden (vgl. S. 54) insbesondere kulturelle Methoden dienen. Dabei kann die Keimgehaltsbestimmung entweder nach dem Plattenverfahren oder in flüssigen Nährsubstraten erfolgen.

a) *Plattengußverfahren* (nach KOCH). Die zu untersuchende Flüssigkeit wird mit sterilem Leitungswasser (oder physiologischer Kochsalzlösung, 0,9%ig) in einigen Proben verdünnt (etwa im Verhältnis 1:10, 1:100, 1:1000 usw.), von diesen Proben mittels stets frischer Pipetten in keimfreie PETRI-Schalen Mengen von 0,1—1 ccm abgefüllt und steriler Agar-Nährboden (von 45° oder Gelatine von 35°) hinzugegossen, durch Neigen und Drehen der Platte vorsichtig durchgemischt (bis keine Schlieren mehr vorhanden sind), auf waagerechter Unterlage erstarren gelassen und sodann in einer feuchten Kammer im Thermostaten aufbewahrt. Nach etwa 48 Stunden erfolgt die Auszählung der Kolonien unter Benutzung einer Lupe mittels besonderer Zählplatten und anderer Vorrichtungen. Berechnung des Keimgehaltes durch Umrechnung der Koloniezahlen auf 1 ccm Aussaat.

β) *Keimgehaltbestimmung mittels flüssiger Nährböden.* Prinzip: Es wird eine so weitgehende Verdünnung der zu untersuchenden Probe vorgenommen, daß sodann bei der Aussaat gleicher Volumina in sterile Nährlösungen teilweise noch Entwicklung auftritt, teilweise nicht mehr (Methode auch bei spezifischen Nährsubstraten geeignet).

Unterteilungsverfahren (anzuwenden, wenn der Keimgehalt einer Probe völlig unbekannt ist), besonders in Form der **Halbierungsmethode** angewendet: Ein bestimmtes Volumen der ursprünglichen oder bereits verdünnten Keimsuspension wird jeweils auf die Hälfte verdünnt (die eine Hälfte für die Kultivierung bereitgestellt, die andere Hälfte weiter verdünnt); nach etwa 48stündiger Bebrütung stellt man fest, in welchem Punkte der Verdünnung noch Entwicklung von Organismen stattfindet; es ist dann noch ein Keim pro Flüssigkeitsvolumen vorhanden gewesen, woraus die Gesamtmenge an Keimen berechnet werden kann.

Gleichteilverfahren (anzuwenden, wenn man über den Keimgehalt der Probe bereits ziemlich gut orientiert ist, also zur Überprüfung): Von der je nach dem Keimgehalt auf ein bestimmtes Volumen verdünnten Probe werden gleiche Mengen (z. B. je 1 ccm) in eine große Anzahl (20–100) mit Nährlösung beschickte Kölbchen verteilt. Bei richtiger Verdünnung darf höchstens in der Hälfte der Kölbchen Mikrobenentwicklung stattfinden.

4. Mikroskopische Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung der Mikroorganismen.

Auf die Beschreibung des Mikroskopes und dessen Handhabung kann hier verzichtet werden; im folgenden gelangen nur einige Methoden des Mikroskopierens zur Besprechung, soweit dieselben für gärungschemische Zwecke von Wichtigkeit sind.

a) **Anfertigung mikroskopischer Präparate.** α) *Einfache Präparate für kurze mikroskopische Untersuchungen:* Auf einem gut entfetteten Objektträger¹ wird eine kleine Menge der zu untersuchenden Kultur mit einem Tropfen Wasser (oder physiologischer Kochsalzlösung) verrieben, das Deckglas aufgesetzt (so, daß keine Flüssigkeit an den Seiten austritt²) und die Untersuchung vorgenommen.

¹ Reinigung der Objektträger und Deckgläser: Nach Gebrauch werden dieselben abgewischt und in einer Glasdose gesammelt, in der sich Alkohol und verdünnte Salzsäure befindet. Hierauf in heißer Sodalösung vom Fett befreit und so lange mit Wasser gespült, bis sie klar erscheinen; schließlich mit verdünnter Salzsäure und nochmals mit heißem Wasser nachgewaschen, mit einem fettfreien nicht faserndem Tuch trocken gewischt. Neue Gläser mit Xylol oder Benzin oder auch Alkohol-Äthergemisch entfettet und mit fettfreier feiner Leinwand trocken gewischt.

² Eventuell ausgetretene Flüssigkeit ist mittels eines Stückchens Filterpapier zu entfernen.

β) *Untersuchung im hängenden Tropfen.* Objektträger mit Hohlraum; dieser mit einem Vaselineinring umzogen; Deckglas, mit einem Tropfen der zu untersuchenden Kultur nach unten, auf die Höhlung aufgelegt, so daß es am Objektträger festklebt. Vornahme der Untersuchung beginnend vom Rande des Präparates.

γ) *Ausstrichpräparat (Trockenpräparat).* Fixierung von Präparaten. Das zu untersuchende Tröpfchen wird möglichst dünn mittels einer Platinnadel auf einem Objektträger verstrichen, an der Luft trocknen gelassen, in der Flamme fixiert, indem der Objektträger mit der bestrichenen Seite nach oben rasch dreimal durch die Flamme gezogen wird. Schonendere Fixierung (unter Vermeidung einer Verschrumpfung, besonders bei Sproß- und Schimmelpilzen) durch Eintauchen in Methanol (3 Minuten) oder in absoluten Alkohol (2—10 Minuten).

b) **Färbemethoden.** Die Färbungen sind zur Charakterisierung der Mikroorganismen von größter Bedeutung, da dieselben auf diese Weise leichter erkennbar werden; ferner sind diese Methoden auch zur Unterscheidung von Organismen geeignet, da gewisse Farbstoffe von manchen derselben aufgenommen werden, von anderen nicht. Unterscheidung der Färbung von Trockenpräparaten (abgetöteter Zellen) und lebender Organismen (Vitalfärbung); im gegebenen Zusammenhang ist die erste Methode von wesentlich größerer Bedeutung.

Farbstoffe (vor allem basische): Am häufigsten Methylenblau und Fuchsin, ferner Methylviolett, Krystallviolett, Gentianaviolett, Bismarckbraun, Malachitgrün. Die erstgenannten in konzentrierter alkoholischer Lösung, die beiden letztgenannten in konzentrierter wäßriger Lösung aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch mit Wasser verdünnt (etwa auf das 1—10fache) und frisch filtriert (am bequemsten in eine Proberöhre, in die ein Faltenfilter ohne Trichter eingesetzt wird).

a) *Gesamtfärbung der Organismen.* Vor allem mit Fuchsin und Methylenblau: das auf einem Deckgläschen angelegte und wie oben fixierte Präparat wird mit der bestrichenen Seite nach unten auf die Farbstofflösung aufgelegt (in einem Schälchen), nach einigen Minuten mit Wasser abgespült (zum Halten dient die CORNETSche Pinzette), mit Filtrierpapier gut abgetrocknet und untersucht. Das Präparat kann auch auf einem Objektträger angelegt werden; es wird dann mit der Farbstofflösung beträufelt; im übrigen wie zuvor.

β) *GRAMSche Färbung.* Dieselbe ermöglicht eine Unterscheidung von Bakterien. Das fixierte, trockene Präparat wird unter Erwärmen 2 Minuten lang mit frisch bereitetem Gentianaviolett-Anilinwasser¹ gefärbt, überschüssige Farbstofflösung mit Filtrier-

¹ 100 ccm Anilinwasser (frisch hergestellt durch Schütteln von etwa 5 ccm Anilin mit 100 ccm Wasser und filtrieren), versetzt mit 11 ccm gesättigter alkoholischer Gentianaviolettlösung.

papier abgetupft, einige Tropfen der LUGOLschen Lösung¹ auf das Präparat gebracht, 1—2 Minuten einwirken gelassen, Überschuß abgetupft, sodann mit einigen Tropfen 96%igen Alkohols entfärbt (etwa $\frac{1}{2}$ Minute). Als grampositiv erscheinen nun alle dunkelblauviolett gefärbten Mikroben, als gramnegativ alle farblosen, die zweckmäßig mit verdünnter Fuchsinlösung nachgefärbt werden, um sie besser sichtbar zu machen. Zur Kontrolle färbt man eine Bakterienart, die sich gegenüber der Gramfärbung bekannt verhält (Modifikation der Gramfärbung vgl. Nachtrag).

Unter den Gärungsorganismen verhalten sich grampositiv: Die meisten Strepto- und Mikrokokken, viele Milchsäurebakterien, die Sarcinen, die sporenbildenden größeren Stäbchenbakterien, die Aktinomyzeten und alle Sproßpilze; gramnegativ: Essigbakterien, die meisten Kurzstäbchen (wie die Coligruppe) und die Vibrionen.

γ) *Sporenfärbung*. Die Sporen nehmen im Gegensatz zum übrigen Zellkörper die Farbe schwerer an und geben sie auch schwerer ab. Das stark fixierte Deckglaspräparat wird in 5%ige Chromsäurelösung gebracht, mit Wasser abgespült und 4 bis 10 Minuten auf der Farblösung (Carbolfuchsin nach ZIEHL² u. a.) unter etwas kräftigerer Erwärmung in schwimmendem Zustand erhalten, oder: Farblösung auf das Deckglaspräparat gebracht (in der CORNETSchen Pinzette eingespannt) und in der Mikroflamme 1 Minute erhitzt (vom ersten Aufwallen an gerechnet). Sodann unter der Wasserleitung abgewaschen, $\frac{1}{2}$ Minute in 5%ige Schwefelsäure eingetaucht, wieder abgespült, in wäßrige Methylenblaulösung gebracht und wieder abgewaschen. Die Sporen erscheinen rot, der übrige Zellkörper (oder rein vegetative Formen) hellblau gefärbt.

δ) *Geißelfärbung*: Wird bei gärungsschemisch wichtigen Organismen wohl nur selten zur Anwendung gelangen. Prinzip: Vornahme einer Beizung zwecks Aufquellen der Geißelsubstanz und nachfolgende Färbung; dadurch wird die Anzahl der Geißeln und die Art des Geißelansatzes sichtbar (nur bei beweglichen Mikroorganismen).

ϵ) *Vitalfärbung*. Einwirkung der sehr stark verdünnten Farbstoffe auf die lebenden Zellen. Farbstoffe: Methylenblau, Methylenviolett, Bismarckbraun, Auramin, Neutralrot usw. Sofortige Untersuchung, da die Zellen später absterben.

ζ) *Herstellung von Dauerpräparaten*. Für Vergleichszwecke von großer Wichtigkeit. Das möglichst wenig Organismen enthaltende gefärbte Präparat wird in Kanadabalsam oder Cedernöl eingeschlossen: Auf das Deckgläschenpräparat wird ein kleiner Tropfen

¹ 1 g Jod und 2 g Jodkali in 300 ccm dest. Wasser.

² 10 ccm gesättigte alkoholische Fuchsinlösung + 100 ccm 5%ige wäßrige Phenollösung.

Kanadabalsam (in Xylol gelöst) gefügt und auf einen völlig sauberen und fettfreien Objektträger aufgedrückt. Nach einigen Tagen ist der Kanadabalsam erhärtet und die Seiten des Deckgläschens werden mit Asphaltlack umstrichen. Jahrelange Haltbarkeit. Genaue Beschriftung auf angeklebten Etiketten. Die Anfertigung von Dauerpräparaten der wichtigsten Gärungsorganismen ist für Vergleichszwecke sowie zur Identifizierung der Organismen sehr wichtig.

c) Messungen unter dem Mikroskop. Am häufigsten unter Benutzung eines *Okularmikrometers* (runde Glasplättchen mit feiner Einteilung), das mit der Teilung nach unten in das Okular eingesetzt wird. Ermöglicht nur relative Messungen. Zur Bestimmung des absoluten Wertes eines Strichintervalles Eichung mit einem Objektmikrometer (Objektträger mit einer Einteilung, bei der 1 mm in 100 Teile geteilt ist, Abstand zweier Striche = 10), jeweils für eine bestimmte Vergrößerung. Vorgang: Bei normaler Tubuslänge des Mikroskopes (die auch später nicht mehr verändert werden darf) werden die Nullpunkte der beiden Skalen zur Deckung gebracht (durch Verschieben des Mikrometers und Drehen des Meßokulars); Ablesung einiger sich deckender Teilstriche und Ermittlung des absoluten Wertes des Meßokulars in sinngemäßer Weise.

d) Zählungen unter dem Mikroskop. (Methoden der direkten Keimzählung.) Die direkte Keimzählung wird vor allem für größere Organismen, wie Hefen benützt. Man bedient sich dabei besonderer Zählkammern oder Apparate. Ein näheres Eingehen auf dieselben erübrigt sich, da den im Handel befindlichen Apparaten eine genaue Beschreibung und Gebrauchsanweisung beigegeben ist, aus der die Herstellung der Mikrobensuspension, die Maßnahmen zur Trennung der einzelnen Zellen voneinander, die Durchführung der Zählung usw. ersichtlich werden (vgl. z. B. SKARSCHEN Apparat, THOMA-ZEISSISCHE Zählkammer, Bakterienzählkammer nach M. STEINER u. a.).

Für die Auszählung von Bakterien verwendet man — falls die betreffenden Bakterien dies ermöglichen — gleichfalls Zählkammern oder Apparate wie für Hefe. Vielfach muß man aber das Auszählen im Dunkelfeld oder unter Benutzung gefärbter Ausstrichpräparate vornehmen. Im allgemeinen wird man zur Keimgehaltsbestimmung in Bakteriensuspensionen lieber eine der S. 53/54 geschilderten Kulturmethoden anwenden.

C. Übersicht der wichtigsten Gärungsorganismen (morphologische und physiologische Kennzeichnung derselben).

1. Hefen.

Vorkommen: Blütennektar, an vielen Pflanzenteilen (Blätter, Rinden usw.) und Früchten (Trauben usw.). Im Boden, in Milch, Mehl, Heringslake, im Darm usw., auch pathogen oder harmlos im lebenden Gewebe des Tierkörpers (Insekten, Wirbeltiere usw.). *Symbiontisches Vorkommen* von Alkoholhefen mit Milchsäurebakterien (z. B. in sauren Milchgetränken wie Kefir, Kumys

usw., ferner bei der Sauerkrautgärung, im sogenannten Ingwerbier usw.) oder mit Essigbakterien (z. B. in der Kombucha).

Morphologische Charakterisierung: Die Hefen (Sproßpilze) sind einzellige, selbständige, sich nur durch Sprossung (Knospung) vermehrende Pilze. Sporenbildung normalerweise selten, kann durch besondere Maßnahmen erzwungen werden (Gipsblockkultur); mit Hilfe der Federstrichkultur, der Riesenkolonien usw. sind weitere morphologische Merkmale erkennbar. Zellen: meist ellipsoidisch, seltener kugelig oder lang gestreckt. Durchschnittsgröße etwa $5 \times 8 \mu$, ausnahmslos unbeweglich, gewöhnlich farblos. Mikroskopisches Bild: meist eine große und mehrere kleine Vakuolen. Kern durch Färbung sichtbar. Einlagerung von Fetttröpfchen¹ (stärker lichtbrechende Körnchen, Fettreaktion). Bei üppigem Nährboden bzw. unter besonderen Bedingungen (vgl. S. 102) tritt Verfettung ein (Anstieg des Fettgehaltes bis etwa 40% der Trockensubstanz), die Zellen sind dann viel größer, zahlreichere Granulationen weisen auf hohen Fettgehalt hin.

Physiologische Charakterisierung: Die alkoholbildenden Hefen sind fakultativ anaerob, Vermehrung und Wachstum an Gegenwart von Sauerstoff gebunden, Gärung auch bei Luftabschluß.

Unterscheidung der Arten: Morphologisch schwierig, infolge der Gleichförmigkeit, nur möglich durch sorgfältiges Studium der Reinkulturen, Züchtungen und Feststellung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften, und zwar: Sporenform, Aussehen der Kolonien, Einfluß von Temperatur und Sauerstoff, Gärvermögen gegenüber verschiedenen Zuckerarten, Enzymgehalt usw.

Einteilung der Hefen in zwei Hauptgruppen je nach dem Vermögen zur Sporenbildung:

Sporenbildende Hefen (Saccharomyces): Hierher gehören die technischen Hefen, vor allem die Alkoholhefen des Gärungsgewerbes; Einteilung derselben nach praktischen Gesichtspunkten (Verwendungszweck usw.); ober- und untergärrige Hefen², stark und schwach gärrige Hefen, flockige und staubige Hefen usw.; unter den Kultur-

¹ Die im Plasma (zum Teil auch in der Vakuole) befindlichen Einschlüsse (Granula, Körnchen) sind meist Fett, seltener auch Eiweiß oder Glykogen oder Volutin (Nucleinsäureverbindungen).

² Charakteristik derselben: Die obergärrigen Hefen (Bier-, Brennerei- und Preßhefen) haben nichtschleimige Zellwände, am Ende der Gärung befindet sich die Hauptmenge oben im Schaum (Raffinose wird durch obergärrige Hefen kaum vergoren). Die untergärrigen Hefen (Bier- und Weinhefen) haben schleimige Zellwände, die Zellen klumpen zusammen und bilden einen festen Bodensatz; der Schaum ist arm an Zellen (Raffinose wird vergoren). — Unterschiede in der Extrahierbarkeit der Fermente und Cofermente.

hefen sind besonders von Wichtigkeit: *Saccharomyces cerevisiae* (Bier-, Brennerei- und Preßhefen) sowie *Saccharomyces ellipsoideus* (Schaumwein- und Obstweihenfen). Einteilungsmöglichkeit auf Grund des Verhaltens gegenüber Disacchariden; Vergärung von: 1. Maltose und Rohrzucker (nicht Milchzucker); die meisten technischen Hefen. 2. Rohrzucker (nicht Maltose und Milchzucker). 3. Maltose (nicht Rohrzucker und Milchzucker). 4. Milchzucker (die sogenannten Milchhefen). 5. Glucose (keine Disaccharide). 6. Kein Gärvermögen.

Sporenlose Hefen (Kloeckera = *Pseudosaccharomyces*, Fungi imperfecti): Meist mit geringem oder keinem Gärvermögen, in der Natur sehr verbreitet; Z. B. als Schädlinge insbesondere saurer oder gegorener Getränke auftretend, ferner in den Gerb- oder Sauerkrautbrühen: Kahlhefen (*Mycoderma*), Torulaarten, *Pastorianus*hefen, *Exiguus*hefe usw. Sodann rote und schwarze Hefen (in Milch und Käse), schließlich auch manche pathogene Hefen.

Übersicht einiger gärungschemisch wichtiger Hefen vgl. in Tab. IX.

2. Bakterien.

Allgemeine morphologische Charakterisierung: Meist farblose (jedemfalls nicht chlorophyllgrüne) einzellige Organismen, die sich ausschließlich durch Zweiteilung („Spaltung“, Spaltpilze) ungemein rasch vermehren; dazu kommen noch manche mehrzellige fädige Formen (Fadenbakterien), die morphologisch zu den Fadenpilzen überleiten. Sporenbildung (stets auf vegetativem Wege) vielfach vorhanden (hochgradige Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Hitze, Eintrocknung, Gifte usw.). Nach neueren Befunden sollen auch ultramikroskopische Entwicklungsformen existieren, die auch Hartfilter passieren (LÖHNIS). Über die eventuelle gärungschemische Bedeutung dieser Formen ist noch nichts bekannt. *Zellform*: Kugelig oder zylindrisch, meist gerade, seltener schraubenförmig (Kugel-, Stäbchen- und Schraubenbakterien). *Zellgröße*: Etwa $0,5 \times 1 \mu$ oder $1 \times 4 \mu$, vielfach kleiner, doch auch größer. *Mikroskopisches Bild*: Zellkern nicht sichtbar, oft lebhaftige Eigenbewegung mit Hilfe von Geißeln (Cilien), die erst nach besonderer Behandlung sichtbar werden (Beizen und Färben, vgl. S. 56). Sporen bei manchen Stäbchenarten vorhanden, stets in der Einzahl, kugelige oder ellipsoide, stark lichtbrechende Gebilde (Stäbchen mit Sporenbildung sind Bacillen, solche ohne Sporenbildung Bakterien.)¹

Nomenklatur: Hinsichtlich der Bezeichnung der Mikroorganismen ist bis heute noch keine einheitliche Regelung erfolgt, da die diesbezüglichen Bemühungen der Bakteriologen noch zu keinem allgemein anerkannten System geführt haben. Zweckmäßigerweise sollte man bei Veröffentlichungen die Bezeichnungen der American Type Culture Collection verwenden².

Physiologische Charakterisierung und Einteilung: Aerobe und anaerobe, fakultativ anaerobe Formen; auf Grund der physiologischen

¹ Die Bezeichnung wird allerdings meist nicht konsequent durchgeführt.

² Auch im vorliegenden Buch ist diesem Vorschlag weitgehendst Rechnung getragen.

Tabelle IX.

Spezies (Beispiele)	Fundort	Haut- bildung	Flocken- bildung	Zellform	Sporen- bildung	Wachs- tumsopt.	Gär- vermögen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Saaz)	Saazer Brauerihefe	0	fest- liegender Bodensatz	ellipsoidisch, rund ¹	+	25—33°	untergärig
Obergärige Brauerihefe	—	0 ²	0 (Trübung)	meist rund, weniger ge- kört ³	+	bis 25°	obergärig
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> (Weinhefe)	reife zucker- haltige Früchte	+	selten	rund bis langgestreckt	+ ⁴	—	untergärig
<i>Mycoderma cerevisiae</i> (echte Kahl- hefe)	Wein- und Bierreste, saure Gurken usw.	+	0	langgestreckt, eiförmig ⁵	0	33°	0
<i>Mycoderma variabile</i> (un- echte Kahlhefe)	Schädling in Hefefabriken	+	0	meist eiförmig, kurz bis langgestreckt ⁶	0	35°	+
<i>Torula utilis</i>	Preßhefe, Früchte	0	—	rundlich, ei- förmig länglich	0	30°	schwach

¹ Mit großen Vakuolen, Riesenzellen häufig.

² Hefehaltiger Schaum.

³ Riesenzellen tellerförmig.

⁴ Sporenbildung setzt frühzeitig ein.

⁵ Verzweigte, sparrige, lockere Spößverbände.

⁶ Bisweilen mycelartige Spößverbände.

Wirkungen anoxydative und oxydative Bakterien. Im folgenden werden die wichtigsten technischen Bakteriengruppen und einige Vertreter derselben kurz besprochen.

a) Milchsäurebakterien. *Vorkommen* (als Erreger der meisten spontanen Säuerungsverfahren): In Maische, Preßhefe, Bier, Wein, Milch, Sauerkohl, Sauerteig, in säuernden Vegetabilien (Gurken, Grünfutter) usw.

Morphologie: Zellform und Zellgröße bei den einzelnen Bakterien sehr verschieden (Langstäbchen, Kurzstäbchen, e- bis kugelförmig).

Physiologische Eigenschaften: Erregung der Milchsäuregärung, dabei verschiedenes Verhalten gegenüber den einzelnen Zuckerarten; Verhalten gegenüber der Temperatur: vielfach wärme- liebend; Thermobakterien. Häufig als Schädlinge bei der Preßhefefabrikation (verursachen Zusammenfloeken der Hefe). Verwendung zur Milchsäureproduktion sowie zur Säuerung von Getreidemaischen bei der Spiritusbrennerei sowie bei der Weißbiererzeugung. Charakteristik einiger Milchsäurebakterien und verwandter Organismen vgl. in Tab. X.

b) Propionsäurebakterien. *Vorkommen:* In Schweizer Käse, spielen bei der Reifung desselben eine Rolle (Lochbildung). Hauptform: Propionibacterium sp. (Bac. acidi propionici), mit vielen Varianten (Stämmen), je nach der Herkunft verschieden.

Morphologische und physiologische Charakterisierung: Zumeist grampositiv, katalasepositiv (manchmal allerdings nur sehr schwach), Gelatine nicht verflüssigend, unbeweglich, in der Regel nicht sporenbildend. Kräftiges Wachstum vor allem unter anaeroben Bedingungen (unter aeroben Bedingungen keine so gute Entwicklung). Wachstum auf Agar meist relativ schlecht. Variabilität der Zellform: Unter anaeroben Bedingungen bilden sich in neutralem Medium kleine Kurzstäbchen, unter aeroben Bedingungen sind die Zellen irregulär geformt, keulenförmig geschwollen, in saurem Medium bilden sich neben den normalen Zellen kleine streptokokkenartige Zellen, lange irreguläre Stäbchen und andere Formen.

c) Butylogene Bakterien. *Vorkommen:* Erde (besonders Gartenerde), Schlamm, Abwässer usw. Gemeinsame Merkmale: Sporenbildung, meist auch Beweglichkeit, hohes Temperaturoptimum, anaerobe Lebensweise, charakteristisch ist das Auftreten von Spindel- oder Clostridiumformen, in denen vielfach je eine Spore vorhanden ist, dabei haben wir es oft mit folgendem Vorgang zu tun: aus den vegetativen Zellen entstehen in einem gewissen Stadium die oft keulenförmigen Clostridiumformen, in denen sich

Tabelle X.

Spezies	Fundort (bzw. Anwendung)	Wachstum			Zellform	Gasbildung	Vergärbare Zuckerarten	Größte gebildete Säuremenge % ¹
		in Agar	in Maische	Temp. opt. °C				
Lactobacillus Delbrückii	Getreide- maische bei 45—50° Milchsäure- fabrikation ²	in Stich- kultur gut	Trübung nach 24 Stunden	42—45 ³	lange, gerade Stäbchen ⁴ , oft gedreht, abnorm	0	Glucose, Fructose, Maltose (auch Rohr- zucker, Galaktose, Dextrin)	1,7
Lactobac. Beijerinckii	in schlecht vergärender Kartoffel- maische; Infektion der Preßhefe	in Stich- kultur gut	flockige Trü- bung nach 24 Stunden; am 3. oder 4. Tag klar	34—38	einzelnen oder zu 2; auch ketten- förmig oder zusammen- geklebt ⁵	0	Glucose, Fructose, Rohrzucker, Maltose, Galaktose, (auch Raffinose, Dextrin)	1,26

Lactobac. helveticum = Thermobact. Helveticum	Schweizer Käse	in Hefeextrakt zu kultivieren	30—40	lange einzelne Stäbchen	+	Maltose, Milchzucker (auch Raffinose, Stärke, Dextrin)	—
Streptococcus lactis = Bac. lactis acidi	Milch, Rahm-säuerung, ¹ Sauerkraut, Grünfuttersilage, Gerbbrühe	gut in Stich-wie Oberflächenkultur	38	länglich eiförmig, meist zu 2 in längeren Ketten ²	0	Milchzucker, Raffinose (auch Mannit)	0,34
Bac. subtilis, Heubacillus	Heu	verflüssigt, Gelatine (auf Agar schlecht)	35	länglich, oft clostridien-ähnlich lebhaft ³ Bewegung ⁴	0	(schwach Glucose, Fructose)	—

¹ Bezogen auf Milchsäure.

² Auch bei der Maischesäuerung verwendet (bei der Spiritusbrennerei sowie Weißbierherzeugung).

³ Gärungsoptimum (in Gegenwart von CaCO₃) gegen 50°.

⁴ In Maische einzeln oder zu 2 bis 3 verbunden. — Kolonien auf Agar klein, flach, wasserhell.

⁵ Kolonien flach, wasserhell, in der Mitte weißlich.

⁶ An der Erzeugung des Butteraromas beteiligt (durch Bildung von Diacetyl).

⁷ Kolonien groß, flach, weißlich glänzend.

⁸ Sehr widerstandsfähige Sporen.

Tabelle X (Fortsetzung).

Spezies	Fundort (bzw. Anwendung)	Wachstum			Zellform	Gas- bildung	Vergärbare Zuckerarten	Größte ge- bildete Säure- menge %
		in Agar	in Maische	Temp. opt. °C				
<i>Bact. coli</i>	in säuernden Pflanzen- aufgüssen, mensch- lichem Darm, Wasser	—	zarte Haut	bis 45	kurze Stäbchen; Größe sehr verschieden; beweglich	+	Glucose, Rohrzucker, Milchzucker	—
<i>Bac. mesentericus</i>	schleimiges Brot	an der Ober- fläche grau- blauer Belag	Haut	35—37	mäßig dicke Stäbchen ¹	—	Glucose u. a.	—
<i>Propionibacterium</i> sp. = <i>Bact. acidi propionici</i>	Schweizer Käse	im Stich gut	—	35	keulen- förmige Lang- stäbchen	+	Glucose, Fruktose, Rohrzucker, Milchzucker	—
<i>Biersarcine</i> (<i>Pedio- coccus</i>)	Gerste, Malz, Stroh, Dünger, Pferdeharn	gut, Kolonien weiß oder gefärbt	gut, Trübung ²	20—26	kugelig, Tetraden	+	Glucose, Maltose u. a.	0,95

¹ Mit sehr widerstandsfähigen ovalen Sporen.² Oft Schleimbildung.

Sporen ausbilden, die nach dem Absterben des übrigen Zellkörpers frei werden. Die Sporen selbst sind meist sehr widerstandsfähig gegen Hitze (2 Minuten langes Kochen in wäßriger Lösung schädigt nicht). Zellen jüngerer Generationen zeigen starke Bewegung; sobald sich die Gärungsprodukte anhäufen (insbesondere bei der Butanol-Aceton-Gärung) tritt auffallende Abnahme der Gärungsorganismen (insbesondere der vegetativen Formen) ein. Bei *Clostr. aceto-butylicum* sind sowohl die vegetativen Formen wie die Clostridien anfangs grampositiv, nach 75 Stunden gramnegativ (sobald die Gärung in der Regel beendet ist). Eine nähere Charakteristik einiger Vertreter dieser Gruppe ist in Tab. XI gegeben.

d) **Cellulose vergärende Bakterien.** Erreger der Methangärung und verschiedener Säuregärungen bei hohen Temperaturen (vielfach bei 60—70°). Noch wenig erforschte Gruppe. Tätigkeit im Boden: Humifizierung der Holzsubstanz; Vorkommen im Schlamm, Pferdemist, regelmäßig im Pansen der Wiederkäuer, ferner im Dünger (allerdings unerwünscht: Speckigwerden desselben). Vornehmlich physiologisch charakterisiert: z. B. Bildung von Essigsäure neben Milchsäure, oder neben Alkohol, oder andere Fettsäuren neben Alkohol und Methan, stets neben CO₂ und H₂; eigentliche Methanbakterien: Bildung von Methan, CO₂ und H₂. Abwasserbakterien: Zersetzung verschiedener organischer Verunreinigungen von städtischen und gewerblichen Abwässern auf Rieselwiesen, in biologischen Füllkörpern usw. Methangärung durch den Faulschlamm („belebten Schlamm“) in Faulräumen.

e) **Essigbakterien.** *Allgemeine Kennzeichnung:* Ausgesprochen aerobe, stets sporenlose, meist unbewegliche Stäbchen, sehr klein: etwa $0,5 \times 1,5 \mu$, meist in oberflächlichen, zarten Häutchen, oft zu langen Ketten verbunden, aber auch untergetaucht, zu Trübungen der Flüssigkeit Anlaß gebend. Kolonienbildung auf festen Nährböden recht verschieden, oft charakteristisch, allerdings auch abhängig von der Züchtungsweise und Entwicklungsdauer. Vermögen zur Gelatineverflüssigung ganz selten. Änderungen der Zellgestalt sehr häufig, von Einfluß sind dabei Temperatur, Alter, Ernährungsweise. Hypertrophische Zellformen (Riesenzellen) unter ungünstigen Wachstumsbedingungen.

Systematik und Einteilung: Von verschiedenen Gesichtspunkten aus versucht worden. Morphologische Unterscheidung schwierig, da alle fast das gleiche Aussehen haben, wohl aber Unterschiede im Säuerungsvermögen gegenüber verschiedenen Alkoholen, Zuckerarten usw. Einteilung nach praktischen Gesichtspunkten, z. B. nach

Tabelle XI.

Spezies	Fundort	Zellform ¹	Kolonien auf Würzegeleatine	Temp. opt. °C	Gärungsprodukte
<i>Clostridium butyricum</i> = <i>Granulobacter saccharobutylicum</i>	Getreide Kartoffeln Erde	bewegliche, mäßig lange, etwas gedrungene Stäbchen; länglich eiförmige Clostridien	klein, hellbraun, wenigzäh, Gelatine nicht verflüssigend	35—40	insbesondere Buttersäure in Gegenwart von CaCO ₃ (anaerob)
<i>Clostridium butyricum</i> = <i>Granulobacter butylicum</i>	Getreide Erde	meist große, gerade Stäbchen, oft in Zellfäden auftretend; spindelförmige oder kaulquappenförmige Clostridien	milchweiß, zäh-schleimig, Gelatine nicht verflüssigend	35—37	insbesondere Butylalkohol und Aceton (anaerob)
<i>Bac. macerans</i>	Kartoffeln Erde	meist fadenförmige Langstäbchen; kaulquappenförmige Clostridien	—	40	Aceton, Alkohol (aerob und anaerob)
<i>Butyl-äthylalkohol-bacillus</i>	Reisschrot	Langstäbchen; verschieden geformte Clostridien	—	34—40	Butyl- und Äthylalkohol (anaerob)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Getreide	Stäbchen bei Luftzutritt; Clostridien mit reichlicher Sporenbildung bei Luftabschluss	—	—	viel CO ₂ , neben wenig Butanol (Übergang zu den Heubacillen)

¹ Je nach den Kulturbedingungen vielfach recht variabel.

HENNEBERG (1909) vier Gruppen: Maische und Würzebakterien, Bieressigbakterien, Weinessigbakterien, Schnellessigbakterien; nach LAFAR (1914) vier Gruppen: Bieressigbakterien, Weinessigbakterien, Schnellessigbakterien, Schleimessigbakterien. Einteilungsversuche auf Grund des chemisch-physiologischen Verhaltens sind noch nicht als befriedigend anzusehen, da stets gewisse Übergänge vorhanden sind, einzelne Bakterienstämme selbst sich verschieden verhalten können und schließlich noch nicht alle physiologischen Merkmale genügend untersucht sind. In Tab. XII sind einige Essigbakterien angeführt, die für technische sowie präparative Zwecke von Interesse sind.

3. Schimmelpilze (Mycelpilze)¹.

Allgemeine Charakteristik: Schimmelpilze sind höher entwickelt als die Sproßpilze und Spaltpilze. Der Pilzkörper besteht aus einer dicht verwebten Fadenmasse (Mycel, aus einzelnen Zellfäden, Hyphen zusammengesetzt). Als Sporen im eigentlichen Sinne (Endosporen) sind nur die im Inneren von Schläuchen, Kapseln usw. entstehenden Fortpflanzungszellen zu bezeichnen. Bei den höchst entwickelten Formen Fruchtorgane (Konidien) nach außen ausgebildet, in oder an denen meist einzellige Sporen (Exosporen, Konidiosporen) gebildet werden; dieselben besitzen verschiedene Form und Farbe (meist charakteristisch) und dienen zur Fortzucht der Pilze (vom Techniker auch als „Sporen“ schlechtweg bezeichnet). Bei einfachen Pilzen Übergangsformen zwischen Hefen und Schimmelpilzen: Bildung von Zellformen, die sich durch Sprossung vermehren, neben den Hyphen. Für die technische Mycologie sind insbesondere folgende Gruppen von Interesse:

Aspergillaceen, insbesondere mit den Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. *Aspergillus*: Die Konidienträger (Sterigmen) bilden an ihrem Ende kolbige oder runde Anschwellungen (Columella), aus denen meist oben oder allseitig Sterigmen und Conidiosporen hervorgehen. Farbe derselben: grün, gelb, braun, grau bis schwarz. Perithetienbildung vorhanden. Optimale Wachstumstemperatur: 27—30°. Manche Arten sind pathogen. *Penicillium*: Färbung der Konidiosporen, des Mycels sowie des Substrates zu unterscheiden, meist grün gefärbte Pilzrasen. Die aus dem Mycel herauswachsenden Konidienträger besitzen lange verzweigte Pinsel mit den Sterigmen und Konidiosporen. Wachstumsoptimum meist zwischen 20 und 30° (vgl. Tab. XIII).

¹ Vgl. dazu THOM und CHURCH: *The Aspergilli*, Baltimore 1927. — THOM: *The Penicillia*, Bailliére, Tindall and Cox, London 1930. — Hinsichtlich des natürlichen Vorkommens von Pilzen vgl. NIETHAMMER: *Die mikroskopischen Bodenpilze*, 's-Gravenhage, W. JUNK, 1937.

Tabelle XII.

Spezies	Fundort	Hautbildung	Trübung der Flüssig- keit	Em- por- ziehen der Haut ¹	Ver- meh- rung °C	Temp. opt. °C	Zellform (Zellen)	Hyper- trophische Zellen	Alkohol ²		Essig- säure ³	
									Vol. %	%	Vol. %	%
<i>Acetobacter aceti</i> (HANSEN)	z.B. ober- gäriges Bier		0	0	++	34	einzel, bei höherer Temp. zu Ketten ver- einigt (faden- förmig)	+	11		6,6	
<i>A. acetosum</i> (HENNEBERG)	z.B. ober- gäriges Bier	fest zusammen- hängend, glatt, weißlich	0	gering	0	28	einzel oder in Ketten	+ ⁴	11		6,6	
<i>A. Pasteurianum</i> (HANSEN)	z.B. ober- gäriges Bier	anfangs feucht, später trocken, marmoriert fein gefaltet	0	0	0	34	groß, breit; oder dicke Kurzstäbchen	+++	9,5		6,2	
<i>A. rancens</i> (BEYERINCK)	z.B. ober- gäriges Bier	trocken, faltig	gering	+			kurze Stäbchen; oft in langen Ketten	+				
<i>A. oxydans</i> (HENNEBERG)	unter- gäriges Lagerbier	sehr zart, oft aus einzelnen Zellen bestehend	+++	++	gering	18—21	rundlich, auch fadenförmig langgestreckt	+++	7		ca. 2	
<i>A. ascendens</i> (HENNEBERG)	Wein- essig	zart, gleich- mäßig	+++ ⁵	+++	0	31	einzel, in Paaren, auch lange Zellfäden	+++	12		9	
<i>A. suboxydans</i> (KLUYVER und DE LEEUW)	Holl. Bier	0	+	0	0	28	klein, rundlich; oft zu 2	+				

A. vini acetati (HENNEBERG)	Wein- essig	zart, wenig zusammen- hängend	++	0	0	28—33	rundlich, kurz oder länglich eiförmig, einzeln bzw. zu 2 oder 3	0	
A. xylinoides (HENNEBERG)	Wein- essig	dünn, locker trocken oder flockenartig schleimig oder zäh und dick	0	0	+++	28	rund, Kurz- oder Lang- stäbchen; unregelmäßig	0	
A. xylinum (BROWN)	Schnell- essig- fabriken	dick, wasser- hell, später weißlich	0	0	+++	26—33	Kurz- bis Lang- stäbchen spiralig gebogen	++	6—7 4,5
A. orleanse (HENNEBERG)	Schnell- essig- fabriken	fest, im Alter zarte Falten	+ ⁶	gering	+	30	rundlich, kurz oder länglich eiförmig, ein- zeln bzw. zu 2 oder 3	++	
A. Schützenbachi (HENNEBERG)	Schnell- essig- fabriken	wenig zu- sammen- hängend, manchmal verschieden gefärbt	+++	0	0	25—30	rund, eiförmig, länglich, ein- zeln, zu 2 oder in Ketten	0	11,5
A. gluconicum (HERMANN)	Korn- bucha	0	++	0	0	28—30	Diploformen 2 eiförmige Zellen mit- einander ver- bunden	0	

¹ An den Gefäßwänden.² Höchste verträgliche Konzentration.³ Größte gebildete Menge.⁴ Spindelrig aufgetrieben.⁵ Feinflockiger Bodensatz.⁶ Nur in mineralischen Nährlösungen.

Tabelle XIII.

Spezies	Fundort (z. B.)	Mycelfarbe		Konidienfarbe		Sterigmen (Konidien- träger) (Form)	Perithezien ¹ Bildung	Sklerotien ² Bildung	Wachstums- optimum
		jung	alt	jung	alt				
<i>Aspergillus niger</i>	feuchtes Brot, faulende Früchte	weiß	gelblich bis braun	braun	bis schwarz	schlank	0	+	30—35°
<i>Aspergillus glaucus</i>	trockenes Brot, eingemachte Früchte altes Leder, Hopfen	hellgelb	schmutzig rostbraun	hell- grün	grau-grün bis grau-braun	gedrungen	+ ³	+	20—27
<i>Aspergillus oryzae</i>	Reis (Sakebereitung, Reiswein)	gelblich	gelblich	gelblich- grün bis gelb	bis braun	schlank ⁴	0	0	35—40
<i>Aspergillus flavus</i>	Brot, Pflanzenteile, trock. Exkremente	gelblich	bräunlich	gelblich grün	bis dunkelbraun	schlank	0	+	gegen 37
<i>Penicillium glaucum</i>	feuchte Nahrungsmittel	weiß	schmutzig grau	hell- bis dunkel grün	bis schmutzig braun	zylindrisch	+	+	gegen 30
<i>Penicillium luteum</i>	Früchte, Citronen	citronengelb bis olivengrün	gelb	mattegrün bis gelb	gelb	zugespitzt (relativ lang)	0	0	
<i>Penicillium purpurogen.</i>	in unreinem Koji	gelbrot	gelbrot	dunkelgrün bis dunkel-graugrün	bis dunkel-graugrün	zugespitzt	0	0	30
<i>Penicillium glabrum</i>	saure Früchte und Lösungen	gelblich	gelblich	grün	grau-grün bis bräunlich	schlank	0	0	gegen 30

¹ Schlauchfrüchte.² Harte, knollige Gebilde; Ruheformen (be-
stehend aus paraplectenchymatischem Gewebe).³ Zunächst hellgelbe, später braune Kapseln.⁴ Oft 2 mm lang, mit einer kugeligen oder ei-
förmigen Blase endigend.

Tabelle XIV.

Spezies	Fundort	Sporangienfarbe		Sporangien-träger	Columella ¹	Gemmen ²	Oidien ³	Wachstums-optimum
		Mycel-farbe	jung alt					
<i>Mucor mucedo</i>	Pferdemist	gelblich-grau	gelblich alt grau-braun	unverzweigt	walzenförmig	0	0	20—25
<i>Mucor racemosus</i>	Brot, Früchte, Malz, Würze	weiß bis gelbbraun	weiß gelbbraun	traubig verzweigt	kuglig oder eiförmig	sehr häufig	+	20—25
<i>Rhizopus nigricans</i>	alle pflanzlichen Substrate	weiß (schwarz punkt.) ⁴	weiß tief-schwarz	oben verbreitert	groß rundlich	0	0	gegen 30

¹ In das Sporangium hineinragendes Hyphenendes (Ende des Sporangiumträgers).

² Gemmen sind aus dem Mycel entstehende (myceliale) Fruchtformen.

³ Bei Luftabschluß (Kugelzellen); „Mucorhefe“.

⁴ Mycel mit Stolonen (Rhizoiden). — Bisweilen sind Zygosporien (geschlechtliche Fruchtformen) vorhanden.

Mucorineen (Köpfchenschimmel): Sporangienträger verzweigt oder unverzweigt mit Endsporangium. Bei der Reife gelangen die Sporen durch Zerreißen der Sporangiumwand ins Freie. Häufig Gemmen oder Chlamydosporen (fortpflanzungsfähige Dauerzellen) in den Hyphen des Mycels. Kugelzellen ähnlich den Hefezellen (mit Sprossung) vielfach vorhanden¹. Hauptvertreter: Mucorarten und Rhizopusarten (bei den letzteren Ausläufer [Stolonen, Rhizoiden] vorhanden). Vgl. Tab. XIV.

II. Methoden zur Durchführung der Gärungen (Gärungstechnik).

A. Gärefäße und Geräte.

Je nach der Art der durchzuführenden Gärung verschieden; insbesondere je nachdem, ob es sich um oxydative oder anoxydative Gärungen handelt. Manche der zur Kultivierung der Gärungsorganismen geeigneten Gefäße (vgl. S. 26 ff.) sind auch zur Durchführung von Gärungen verwendbar.

1. Anoxydative Gärungen.

a) **Einfache Gärefäße.** *a) Für Kleinversuche:* ERLÉNMEYER- oder Stehrundkolben von passender Größe, versehen mit Gärverschluß (vgl. Abb. 7). Derselbe wird mit etwa 20%iger Schwefelsäure oder noch besser mit Glycerin gefüllt.

β) Für Großversuche: Benutzung großer gewöhnlicher Flaschen (von 10—15 l Inhalt) oder großer Glasballons² (von 30—60 l Inhalt), versehen mit Rückflußkühler und Gaswaschflasche (um leicht flüchtige Gärprodukte zurückzuhalten) sowie einer leicht verschließbaren Öffnung zur Probeentnahme (vgl. Abb. 8).

b) **Gärgeräte mit Rührvorrichtung.** Benutzung WOLFFScher Flaschen mit Rührwerk (Abb. 9), Rühraufsatz mit Wasser (oder Quecksilber) gefüllt, dient zugleich als Gärverschluß. Ein oberer Tubus wird zumeist mit Tropftrichter oder Burette usw. zu ver-

¹ Hinsichtlich der Bedingungen für die Bildung von Kugelhefe sowie Besonderheiten im physiologischen Verhalten derselben vgl. H. LÜERS, R. KÜHLES und H. FINCK: Bio. Z. **217**, 253 (1930).

² Z. B. gewöhnliche Säureballons.

sehen sein, der andere Tubus kann zum Hinzufügen fester Stoffe dienen (z. B. CaCO_3 , Zusatz von Hefe usw.); der untere Tubus dient

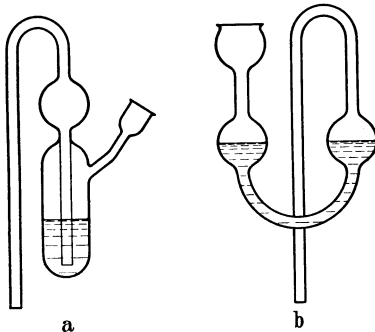


Abb. 7. Gärverschlüsse.

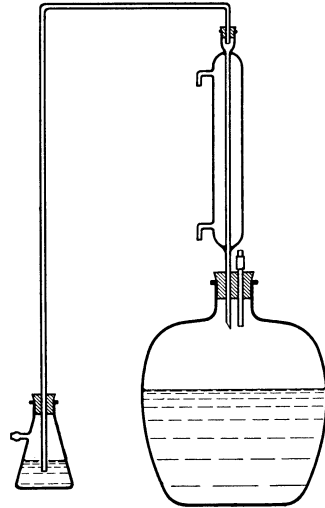


Abb. 8. Anordnung für große Gärversuche.

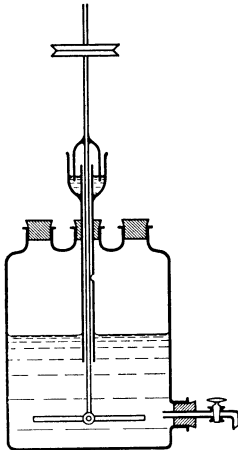


Abb. 9. Gärgefäß mit Rührwerk.

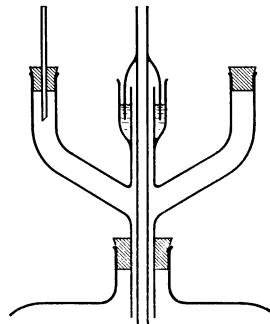


Abb. 10. Rühraufsatz für große Gärgefäße.

zu Probeentnahmen. Für große Gärgefäße (z. B. Glasballons) benutzt man einen Rühraufsatz (Abb. 10) in sinngemäßer Weise.

2. Oxydative Gärungen.

a) Anordnungen für Oberflächengärungen. a) *Einfache Gärgefäße für Oberflächengärungen*: ERLLENMEYER-Kolben, FERNBACH-Kolben (vgl. Abb. 15), PREISS-Kolben¹, HOULE-Kolben, Kultur-

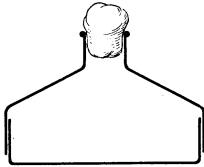


Abb. 11.
Kulturkolben nach HIDA.



Abb. 12.
PREISS-Kolben.

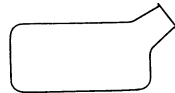


Abb. 13.
HOULE-Kolben.

kolben nach HIDA² (vgl. Abb. 11—13), große Glasschalen oder Metallschalen (z. B. aus Aluminium). Einrichtungen zum Auswechseln der Flüssigkeit, für Probeentnahmen sowie Zusätze: z. B.

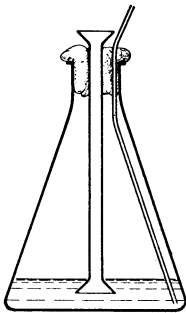


Abb. 14.
ERLENMEYERkolben
mit Anordnung zur
Probeentnahme und
Auswechslung der
Flüssigkeit sowie zum
Zusetzen fester Stoffe.

ERLENMEYER-Kolben mit Rohr zum Zusetzen von CaCO_3 , sowie einem zweiten Rohr zum Austausch der Flüssigkeit und zur Probeentnahme unter völlig sterilen Bedingungen (vgl. Abb. 14). Einrichtung eines FERNBACH-Kolbens zur Probeentnahme sowie zum Auswechseln der Flüssigkeit (Abb. 15). Bei a befindet sich ein Wattebausch, bei b eine Graduierung. Die Handhabung ist wohl ohne weiteres verständlich.

β) *Oberflächengärungen in größerem Maßstab*. Am zweckmäßigsten ist der Sterilinkubator von NORD³, der ohne weitere Hilfsgeräte sofort verwendbar ist (vgl. Abb. 16).

Von Wichtigkeit ist bei diesen Oberflächengärungen stets die Schaffung einer richtigen Beziehung zwischen Oberfläche und Volumen,

¹ Man verwendet dieselben zweckmäßiger Weise nur bei gleichzeitiger Belüftung des Gasraumes, da sonst die Sauerstoffversorgung schlecht ist.

² HIDA: J. of the Shanghai Sc. Inst. [4] 1, 201 (1935).

³ F. F. NORD, H. HOFSTETTER und E. DAMMANN: Bio. Z. 293, 231 (1937). — Hinsichtlich anderer derartiger Apparate vgl. PETERSON, PRUESS, GORCICA und GREENE: Ind. Chem. 25, 213 (1933); s. ferner MAY, HERRICK, MOYER und HELLBACH: Ind. Chem. 21, 1198 (1929); RAISTRICK und Mitarbeiter: Trans. Roy. Soc. London B 220, 136 (1931).

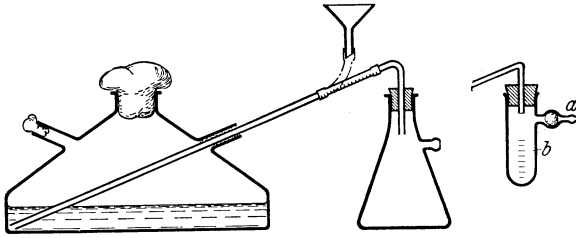


Abb. 15. FERNBACH-Kolben mit Anordnung zum Auswechseln der Kulturflüssigkeit sowie zu Probenentnahmen.

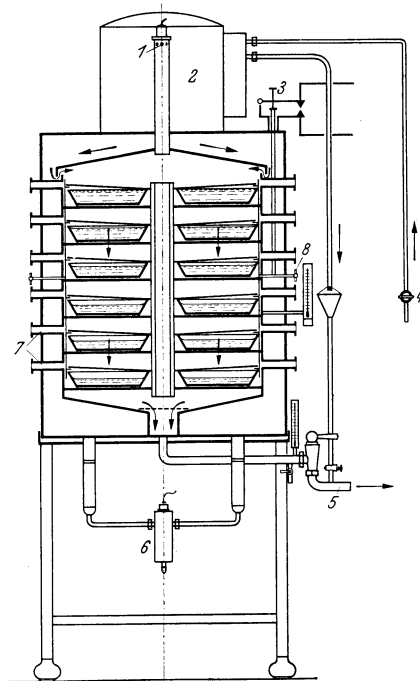


Abb. 16. Sterilinkubator von NORD.

- | | |
|--|--|
| 1 = Entlüftungstubus. | 6 = Heizpatrone zum Sterilisieren der eintretenden Luft. |
| 2 = Dampfwickler (zwecks Sterilisation). | 7 = Impftuben. |
| 3 = Thermoregulator. | 8 = Hebel zum Heben der Glasdeckel der Kulturschalen. |
| 4 = Anschluß an die Wasserleitung. | |
| 5 = Abfluß des Kondenswassers. | |

(Die Pfeile im Innern des Sterilinkubators geben den Weg des Dampfes bei der Sterilisation an.)

da die Sauerstoffversorgung nur von der Oberfläche her erfolgen kann. Die Schichthöhe ergibt sich aus dem Verhältnis des Volumens (in Kubikzentimeter) zur Oberfläche (in Quadratcentimeter), also z. B. bei einem Volumen von 2000 ccm und einer Oberfläche von 1000 qcm ist das Oberflächen/Volumen-Verhältnis = 2 und daher die Schichthöhe 2 cm. Ebenso ergibt sich die Größe der Oberfläche aus dem Verhältnis Volumen/Schichthöhe. Die Umsetzung des Substrates ist um so rascher, je kleiner die Schichthöhe ist; bei größeren Oberflächen konnten bisher in Laboratoriumsversuchen noch Flüssigkeiten von 5 bis 6 cm Schichthöhe gut verarbeitet werden, doch war dabei naturgemäß die Versuchsdauer entsprechend verlängert.

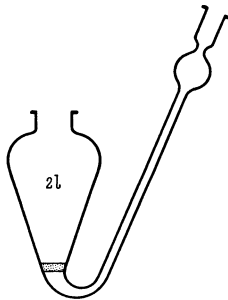


Abb. 17. Belüftungsgefäß.
nach KLUYVER

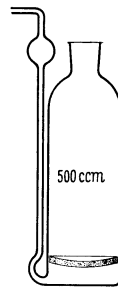


Abb. 18. Gaswaschflasche
(SCHOTT und Gen. Nr. 101 a).

γ) Anordnungen für Oberflächenwachstum unter Rühren; Benutzung eines Gärgefäßes gemäß Abb. 9: durch den einen oberen Tubus wird ein Rohr eingesetzt, das oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche endet und zur zeitweisen Luftdurchleitung dient. Da zunächst Mycelentwicklung an der Oberfläche stattfindet (z. B. bei Schimmelpilzen), darf mit dem Rühren erst nach vollkommener Ausbildung der Pilzdecke begonnen werden. Sowohl Luftdurchleitung wie das Rühren (z. B. Aufschlämmen von CaCO_3) ist vorsichtig vorzunehmen.

δ) Anordnung für Gärungen unter Berieselung; z. B. für Oxydationen mit Essigbakterien gemäß dem Prinzip der Schnellessigfabrikation. Benutzung eines Rieselturmes mit Anordnung zum Durchleiten von steriler Luft und zum automatischen Hinaufdrücken der Gärlösung (vgl. Übung 35 c).

b) Anordnungen für submerse Gärungen. Es sind hier einige Typen von Versuchsanordnungen entwickelt worden, je nach dem Zweck und den Organismen:

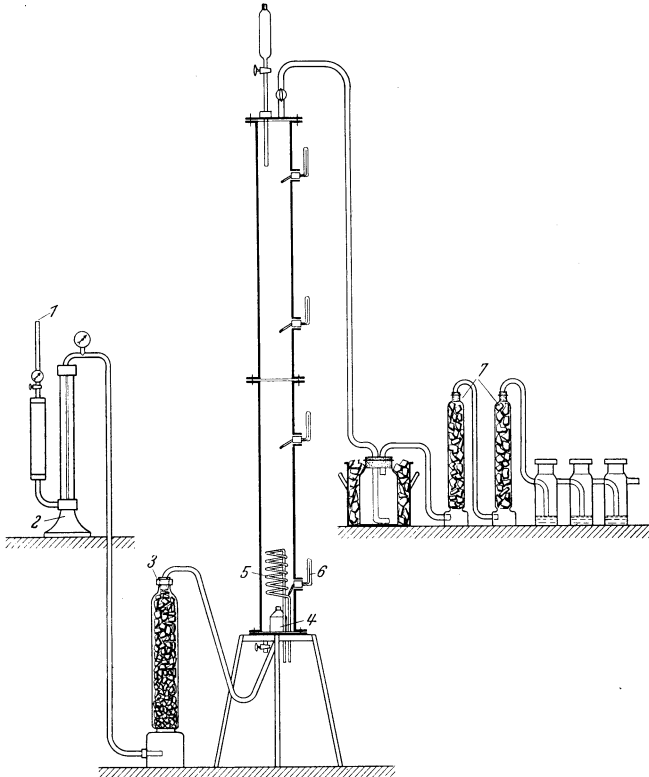


Abb. 19. Hefezüchtungsapparatur nach FINK (Belüftungsapparat Modell I).

1 = Anschluß an die Preßluftleitung.

2 = Filterung und Messung der Luft.

3 = Absorptionsturm.

4 = Filterkerze.

5 = Heizspirale.

6 = Thermometer.

7 = Einrichtungen zum Auffangen flüchtiger Gärprodukte.

a) *Belüftungsgefäße* mit einem Boden aus Sinterglas (G 3), wodurch eine sehr feine Luftverteilung gewährleistet wird: Belüftungskolben nach KLUYVER¹ (vgl. Abb. 17) oder Gaswaschflasche (vgl. Abb. 18)².

¹ KLUYVER, DONKER und VISSER T'HOFFT: Bio. Z. **161**, 361 (1925).

² Empfohlen von MAY, HERRICK, MOYER und WELLS: Ind. Chem. **26**, 575 (1934).

Ferner kann man auch große unten tubulierte Flaschen mit eingedichteten Filterkerzen benützen. Für größere Versuche können die Modelle I¹ oder II² (Abb. 19 und 20) verwendet werden. Modell I benützt eine Filterkerze zur Gasverteilung, Modell II

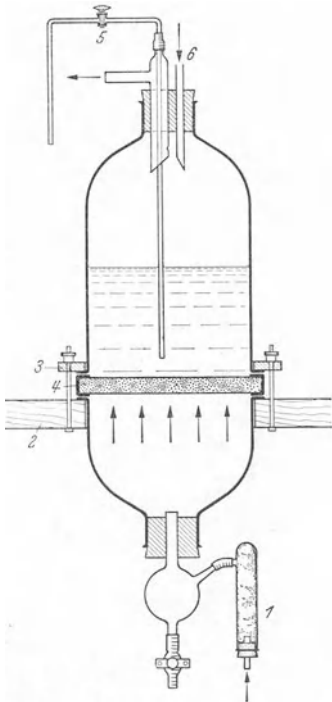


Abb. 20.
Belüftungsapparatur, Modell II.

- 1 = Wattefilter.
- 2 = Holzgestell.
- 3 = Metallring mit Schraubenschluß.
- 4 = Gummimanschette.
- 5 = Hahn zur Probeentnahme.
- 6 = Ansatz für die Zulaufvorrichtung.

eine poröse Platte³; Modell I ist zur direkten Heizung eingerichtet, während II in einem konstant geheizten Gärraum unterzubringen ist. In Abb. 19 sind auch alle Geräte für eine genaue Stoffwechseluntersuchung eingezeichnet. Bei Modell I können auch mehr als zwei Glaszylinder übereinander angebracht werden; auch bei Modell II kann der Nutzinhalt durch Dazwischenschalten von Glaszylindern zwischen die obere Glocke und die poröse Platte vergrößert werden. Dies ist besonders bei schäumenden Flüssigkeiten von Wichtigkeit.

Für noch größere Versuche kommen Metallapparaturen⁴ oder Holzgeräte in Frage (vgl. auch S. 94).

Alle Anordnungen sind besonders geeignet zur Züchtung von Hefen, manche auch für Oxydationen mit Essigbakterien. — Für Pilze meist nicht sehr geeignet, da die porösen Platten allmählich durch zuwachsendes Mycel verlegt werden.

β) *Erzeugung von Schüttelmycel.*
Man arbeitet dabei nach KLUYVER⁵

¹ FINK, LECHNER und KREBS: Bio. Z. **299**, 28 (1938).

² Im eigenen Laboratorium ausgearbeitet. Vgl. dazu KNOBLOCH: Diss. Prag 1938.

³ Filterkerzen sowie poröse Platten sind z. B. durch das Filterwerk Meißen beziehbar.

⁴ BRAUN und PFUNDT: Bio. Z. **287**, 116 (1936).

⁵ KLUYVER und PERQUIN: Bio. Z. **266**, 68 (1933). — PERQUIN: Diss. Delft 1938.

in ERLÉNMEYER-Kolben, die auf einer Schüttelmaschine montiert sind, die in der Minute 80 Hin- und 80 Herbewegungen macht (vgl. dazu Übung 48d). Anordnung besonders zum Studium grundsätzlicher Fragen bei Pilzgärungen geeignet, da ein homogenes Zellmaterial erzeugt wird (im Gegensatz zum Oberflächenmycel).

γ) *Submerse Gärungen in der Gärtrommel unter erhöhtem Druck.* Diese Anordnung hat sich insbesondere für technische oder halbertechnische Zwecke vorzüglich bewährt. Kleinere Apparate können aber auch für laboratoriumsmäßige Versuche verwendet werden. Das Wesentliche der Anordnung ist schematisch aus Abb. 21

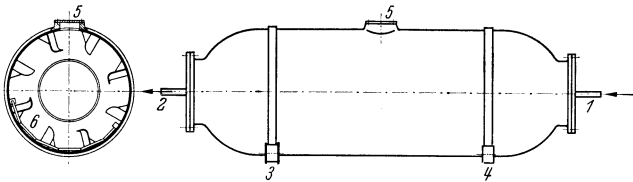


Abb. 21. Schema einer Gärtrommel.

- | | |
|-------------------------|------------------------------------|
| 1 = Luftzutritt | } Rotationsachse mit Stopfbüchsen. |
| 2 = Luftaustritt | |
| 3 = Antrieb samt Lager. | |
| 4 = Lager. | |
| 5 = Einfülltrichter. | |
| 6 = Schaufeln. | |

ersichtlich. Die Gärtrommel dreht sich um eine horizontale Achse. Die im Innern befindlichen Schaufeln bewirken eine Verstäubung der Flüssigkeit in der durchstreichenden Luft (vgl. dazu Anhang zu Übung 42). Die Anordnung ist sowohl für oxydative Bakteriengärungen wie Pilzgärungen vorzüglich geeignet und scheint die Zukunftsmethode der oxydativen Gärungen überhaupt vorzustellen.

B. Die Durchführung der Gärungen.

1. Das Ansetzen der Gärversuche im allgemeinen.

a) **Vorbereitung der Organismen.** Wir haben hier zweierlei Möglichkeiten zu unterscheiden, und zwar je nachdem, ob man die Gärungsorganismen in dem zu vergärenden Substrat direkt zur Entwicklung bringt, oder ob man mit Massen der betreffenden Organismen arbeitet. Während im ersten Fall die zu vergärenden Substrate alle erforderlichen Nährstoffe enthalten müssen, können im zweiten Fall Lösungen der zu verarbeitenden Stoffe allein verwendet werden. Für beide Fälle sind zunächst die Impfkulturen in zweckmäßiger Weise vorzubereiten (vgl. dazu auch S. 47 und 50).

a) *Die Entwicklung der Gärungsorganismen im Gärsubstrat* ist insbesondere bei der Durchführung von Gärungen unter technischen Gesichtspunkten von Wichtigkeit. Vor dem Ansetzen

eines Versuches muß für die rechtzeitige Vorbereitung der Kulturen gesorgt werden, mit denen das Gärsubstrat dann geimpft wird.

Bei *Hefen* können die Reinkulturen auf festen Substraten (Agarnährböden) vorbereitet werden. Die Impfung erfolgt durch Aufschwemmung in sterilem Wasser und Zusatz der Suspension zum Nährboden. Für größere Gärversuche bereitet man zunächst in der geschilderten Weise einen kleineren Ansatz vor, und fügt dann, sobald kräftiges Wachstum bzw. Gärung eingetreten ist, diesen insgesamt zu dem vorbereiteten großen Gäransatz.

Bei *Bakterien* geht man grundsätzlich in der gleichen Weise vor, und impft von der Stammkultur (auf festem oder flüssigem Substrat) zunächst in einen kleinen Ansatz ein, den man dann nach genügender Entwicklung (meist nach 1—2 Tagen) zu dem 10- bis 20fach größeren Gäransatz hinzufügt.

Bei *Schimmelpilzen* impft man mittels einer Sporensuspension, die man durch Abspülen der in Agarröhrchen gezüchteten Kulturen gewinnt. Die Sporenkultur soll nicht älter als etwa 1—4 Wochen sein. Vgl. dazu auch S. 47 sowie Übung 46 c. (Technisch wird auch durch Einblasen der reifen Sporen geimpft.)

β) *Arbeiten mit fertigem Organismenmaterial*: Diese Methode wendet man insbesondere für die Klärung wissenschaftlicher Fragen an; sie ermöglicht infolge der Anwendung großer Massen von Organismen eine rasche Verarbeitung des dargebotenen Substrates (vielfach innerhalb weniger Stunden). Andererseits können so auch Stoffe vergoren werden, die schädigend wirken und keine Entwicklung der Gärungserreger gestatten. Die benutzten Organismenmassen dienen in gewissem Sinn als Ersatz für Enzympräparate. Man benutzt daher auch, um klare Verhältnisse zu schaffen, nach Möglichkeit Organismen, die frei von Reservestoffen sind, so daß tatsächlich nur die dargebotenen Substrate verarbeitet werden. Die Herstellung der betreffenden Organismenmassen erfolgt grundsätzlich gemäß dem unter a) Gesagten.

Hefen: Man arbeitet in der Regel mit Bier- oder Brauereihefen, die man in frischem Zustand bezieht und einer Vorbehandlung unterwirft (Waschen, Abpressen usw.).

Besonders für enzymchemische Untersuchungen ist eine Verarmung der Hefe an Reservestoffen von Wichtigkeit, da dadurch die Eigengärung und Eigenatmung wesentlich herabgesetzt werden kann. Der Wert der „verarmten“ Hefe für enzymatische Untersuchungen ist dem der „ruhenden Bakterien“ (vgl. unten) durchaus ähnlich.

Bakterienmassen werden durch Züchtung der Bakterien in besonderen Substraten hergestellt, durch Abzentrifugieren gewonnen und dann noch einer Vorbehandlung unterzogen (vgl. z. B. Übung 18 b sowie 37).

Besonders kleine Bakterien müssen mit einer Superzentrifuge gewonnen werden¹.

Die Methodik der „ruhenden Bakterien“ (Quastel 1924) bietet wesentliche Vorteile. Derartige Bakterien vermögen allerdings nicht immer die gleichen Wirkungen zu entfalten, wie die wachsenden und in voller Gärung befindlichen Zellen. Sehr wichtig dürfte hier auch das Alter und die Art der Vorzüchtung der gewonnenen Bakterien sein (vgl. auch Anhang zu Übung 42).

Schimmelpilze: Man arbeitet z. B. mit „fertigen“ Pilzdecken, die auf einem besonderen Nährboden hergestellt werden; das Substrat wird dann unter Schonung der Decken gut entfernt, die Pilze noch hungern gelassen und schließlich die zu verarbeitende Lösung eingefüllt. Wenn ein möglichst homogenes Zellmaterial verwendet werden soll, so arbeitet man mit submersem Mycel, das durch Luftdurchleitung oder mittels der Schüttelkultur gewonnen wird (vgl. S. 77 ff. und Übung 48 d).

Für die Wirksamkeit derartigen Mycelen in bestimmter Hinsicht (also für den Gehalt an bestimmten Enzymen und Enzymkomplexen) ist vor allem die Art der Züchtung des Pilzes von ausschlaggebender Bedeutung (Gehalt der Lösung an N, P usw.) Die Bedingungen sind dabei allerdings andere als bei der Oberflächenkultur.

b) Herstellung der Gärsubstrate. Je nach Art der Gärung sehr verschieden (Maischen, klare Lösungen usw.). Von großer Wichtigkeit ist die Sterilisation der Gärsubstrate (Methoden vgl. S. 37), und zwar erfolgt dieselbe am einfachsten direkt in den Gärgefäßen; starkwandige Gefäße, die ein Erhitzen nicht vertragen, müssen durch Ausspülen mit Sublimatlösung keimfrei gemacht werden. Nach gründlichem Waschen mit sterilem Wasser wird die in passenden Kolben sterilisierte Gärflüssigkeit eingefüllt.

Ansetzen anaerober Gärversuche: Nach dem Impfen wird die Luft aus den Gärsubstraten sowie oberhalb dieser durch Einleiten eines sterilen inerten Gases (Stickstoff, Wasserstoff, Kohlendioxyd) verdrängt und dann der Gärverschluß aufgesetzt.

¹ Vgl. z. B. die Gewinnung von Butylbakterien mittels einer SHARPLES-Zentrifuge: JANKE und SIEDLER: Bio. Z. **292**, 112 (1937).

2. Die Technik der Gärführung.

a) **Konstanthaltung der Gärbedingungen.** *a) Einhaltung der günstigsten Gärtemperatur.* Vornahme der Gärungen in der Regel in Thermostaten oder Gärkammern mit konstanter Temperatur, kurzfristige Versuche eventuell auch in Wasserbädern. Kontrolle der Temperatur in bestimmten Zeitintervallen.

β) Die Regelung des Feuchtigkeitsgehaltes in den Gärkammern kann auch manchmal von Wichtigkeit sein, insbesondere bei Gärprozessen, bei denen Oberflächenentwicklung stattfindet (oxydative Gärungen).

γ) Zusätze während der Gärung: Dieselben erfolgen Hand in Hand mit der Kontrolle des Gärverlaufes; dabei wird man weiteres Gärsubstrat (in fester Form oder gelöst), oder Salze oder CaCO_3 usw. zur Regelung des Gärverlaufes zuzusetzen haben. Ferner sind vielfach Substanzen hinzuzufügen, die während des Prozesses verarbeitet oder umgewandelt werden sollen (z. B. bei den Acyloinkondensationen oder Hydrierungen durch Hefe usw.) oder auch weitere Mengen des Gärungserregers (z. B. Hefe oder Bakterienmassen).

b) **Kontrolle des Gärverlaufes.** In der Regel ist eine Angärung, Hauptgärung und Nachgärung zu unterscheiden, wobei insbesondere die Hauptgärung einen raschen und intensiven Verlauf nimmt. Sehr wichtig ist die Ermittlung des günstigsten Zeitpunktes für den Abbruch der Gärversuche, um unerwünschte sekundäre Prozesse zu vermeiden. Die Kontrolle des Gärverlaufes erfolgt einerseits durch die Beobachtung der äußeren Erscheinungen des Vorganges und andererseits durch die Feststellung der Gasentwicklung und Verfolgung der Umsetzung des Substrates selbst.

a) Gasentwicklung: Die Beobachtung derselben ist entweder mit Hilfe eines Gäraufsatzes oder durch Auffangen und Messen der Gase möglich.

β) Probeentnahme aus dem Gärsubstrat unter sterilen Bedingungen (mittels Pipetten oder Ablaßhähnen), wofür passende Anordnungen an den Gärgefäßen zu treffen sind. Durchführung einfacher qualitativer Prüfungen oder quantitativer Bestimmungen der Gärprodukte, Ermittlung des pH -Wertes usw. (vgl. Übungsbeispiele).

c) **Die Durchführung von Bilanzversuchen.** Neben der Bestimmung der nichtflüchtigen Gärprodukte muß bei der Aufstellung von Gärungsbilanzen auf die Ermittlung der gasförmigen Produkte besonderes Gewicht gelegt werden. Dies bildet viel-

fach auch die Grundlage für die Aufstellung eines Gärungschemas¹. Methodisch kommt man zumeist mit relativ einfachen Versuchsanordnungen aus (vgl. S. 110), manchmal wird man aber auch besondere Apparaturen verwenden müssen, die die Aufstellung einer vollständigen C-Bilanz ermöglichen sollen. So wurde von BIRKINSHAW und RAISTRICK² ein Apparat beschrieben, der die Züchtung von Organismen in einem in sich geschlossenen System gestattet, wobei durch einen sterilen Gasstrom (Luftstrom usw.) die gasförmigen Stoffwechselprodukte durch Absorbentien geleitet werden. So wird CO₂ in Lauge aufgefangen, flüchtige Produkte wie Alkohole, Aldehyde usw. in Schwefelsäure, ferner wird der C-Gehalt der Organismenmasse und der vergorenen Lösung bestimmt (flüchtige und nicht flüchtige neutrale Produkte, flüchtige und nicht flüchtige Säuren usw.)³.

Für das Arbeiten mit Enzympräparaten, ruhenden Bakterien usw. bedient man sich zur Messung und Verfolgung des Gasstoffwechsels vor allem der manometrischen Mikromethode nach BARCROFT-WARBURG⁴. Zur Durchführung größerer Versuche eignet sich das von JANKE und KROPACZY⁵ beschriebene Reaktionsgefäß. Einen Respirationsapparat für Bakterienkulturen hat auch ILLÉNYI beschrieben⁶.

C. Anhang.

Prinzipielles über die Aufarbeitung der Gäransätze.

Im folgenden werden nur einige prinzipielle, kurze Hinweise gemacht, um einen Überblick über die verschiedenen Methoden zur Gewinnung der Gärprodukte zu ermöglichen. Alles weitere ist aus den Übungsbeispielen ersichtlich.

1. Gewinnung gasförmiger Gärprodukte.

Bedeutung der gasförmigen Gärprodukte bei technischen Gärungen: Während das bei den meisten Gärungen entwickelte CO₂ vielfach verloren gegeben wird, sind die Gärgase manch-

¹ Grundsätzliches vgl. S. 9.

² BIRKINSHAW und RAISTRICK: *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, Serie B 1931.

³ Hinsichtlich der maßanalytischen Bestimmung des Restkohlenstoffs in biologischen Flüssigkeiten vgl. KOCHOLATY: *Bio. Z.* **286**, 186 (1936).

⁴ WARBURG: *Bio. Z.* **142**, 317 (1923); **152**, 51 (1924); **164**, 481 (1925).

⁵ JANKE und KROPACZY: *Bio. Z.* **277**, 268 (1935).

⁶ ILLÉNYI: *Bio. Z.* **295**, 117 (1937).

mal auch von großer Bedeutung, wie z. B. bei der Butanol-Aceton-Gärung (Gemisch von CO_2 und H_2 , Verarbeitung zu Methanol) sowie bei der Methangärung (Gemisch von Methan, CO_2 und H_2 , Verwendung als Leuchtgas).

Bedeutung der gasförmigen Gärprodukte in wissenschaftlicher Hinsicht: Die Berücksichtigung derselben ist für die Aufstellung von Stoffwechselbilanzen von grundsätzlicher Bedeutung und ermöglicht vielfach auch Rückschlüsse auf den Gärungstypus.

Auffangung der gasförmigen Produkte (nur bei Durchführung von Gärungen in geschlossenen Gefäßen) in Eudiometerrohren, Gasometern usw. Messung und Analyse derselben. Die gasförmigen Stoffe machen zumeist einen sehr beträchtlichen Teil der Gärungsendprodukte aus.

2. Gewinnung flüchtiger Gärprodukte.

Man macht dabei fast stets von der Flüchtigkeit der betreffenden Gärprodukte mittels Wasserdampf Gebrauch und gewinnt dieselben durch Destillation. Vielfach ist eine Trennung in nichtsaurer und saurer Gärprodukte erforderlich, indem zunächst die Säuren als Salze gebunden und die nichtsaurer Bestandteile abdestilliert werden, und sodann nach dem Freisetzen der Säuren auch diese.

a) Isolierung nicht saurer Gärprodukte. Es handelt sich dabei um Alkohole, Aldehyde und Ketone. Gewinnung durch Destillation der verdünnten wäßrigen Lösung. Reindarstellung durch anreichernde Destillation und sodann durch fraktionierte Destillation. Z. B. Äthanolgärung, Butanol-Aceton-Gärung, Äthanol-Aceton-Gärung usw.; ferner Gewinnung von Glycerin durch besondere Destilliermethoden (Vakuumdestillation mit überhitztem Wasserdampf) usw.

b) Isolierung flüchtiger Säuren. Dieselbe erfolgt vielfach gleichfalls durch Destillation, wie die Gewinnung der Essigsäure, Propionsäure, eventuell auch Buttersäure, oder auch in Form von Salzen (z. B. Ca-Butyrat); Konzentrierung der Säuren entweder durch weitere Destillation oder durch Abneutralisieren, Verdampfen und Freilegen der Säuren.

3. Gewinnung nicht flüchtiger Gärprodukte.

Dabei wird vielfach eine Vorreinigung der Lösungen erforderlich sein, so z. B. vor allem durch Filtration, durch Ausfällung von Eiweißstoffen, von Kohlehydraten usw.; hierauf kann die Gewinnung durch Abscheidung von schwer löslichen Salzen erfolgen. Leicht lösliche Produkte gewinnt man nach der Verdampfung der Lösung oder durch Extraktion.

a) Gewinnung schwer löslicher Salze. Dieselben krystallisieren entweder bereits in den Gär Lösungen aus (z. B. Ca-Fumarat, oder Ca-5-Keto-gluconat, Ca-Oxalat usw.) oder es entstehen Salze, die erst in der Hitze ausfallen (z. B. Ca-Butyrat) oder es werden bei der Gärung die freien Säuren gebildet und diese sodann in schwerlösliche Salze umgewandelt (z. B. Ca-Citrat). Die freien Säuren werden aus den Ca-Salzen in der Regel durch Umsetzen derselben mit Schwefelsäure gewonnen.

b) Gewinnung leicht löslicher Gärprodukte durch Verdampfung. Durch die Konzentrierung der Gärlösungen gelingt es vielfach, leicht lösliche Salze zur Abscheidung zu bringen (z. B. Ca-Lactat, Ca-Gluconat usw.); manchmal bietet dies auch einen Weg zur Gewinnung der freien Substanzen selbst (z. B. 1-Sorbose, Dioxyaceton usw.).

c) Gewinnung von Gärprodukten durch Extraktion. Vielfach wird es sich dabei um die Isolierung aromatischer Verbindungen handeln, so z. B. um manche bei Acyloinkondensationen oder bei Hydrierungen mittels Hefe gebildete Reaktionsprodukte (z. B. Phenylacetylcarbinol, Benzylalkohol usw.). Ferner können so auch Bernsteinsäure, Milchsäure u. a. Gärprodukte gewonnen werden.

Zweiter Teil:

Übungsbeispiele.

I. Hefegärungen.

A. Züchtung von Hefe und Herstellung
von Hefezubereitungen.

1. Übung:

Mikroskopische Hefeuntersuchung¹.

a) **Bierhefe (untergärige Hefe).** Untersuchung von gärender Maische aus einer Bierbrauerei (oder von frischer Bierhefe in wäßriger Suspension) bei starker Vergrößerung (500—600fach). Sichtbar sind die kugelrunden bis ellipsoidischen Zellen, im Innern eine große oder mehrere kleine Vakuolen und einige stärker lichtbrechende Körnchen oder Tröpfchen (Fett). Zahlreiche Zellen sind in Vermehrung (Sprossung) begriffen, indem an den Zellen eine (seltener mehrere) kleine knopfförmige Anschwellungen sich bilden, die allmählich Gestalt und Größe der Mutterzellen erreichen und dann abgetrennt werden. Bei sehr lebhafter Entwicklung sind die Tochterzellen zu kleinen, stellenweise verzweigten Ketten vereinigt (bei langsamer Vermehrung erfolgt Trennung der Zellen vor jeder neuen Sprossung).

Untersuchung verarmter Hefe (z. B. kühl gelagerte, 14 Tage alte untergärige Bierhefe, die noch 1—2 Tage bei 25—35° unter viel Wasser aufbewahrt wurde, vgl. auch S. 107): Zwecks Sichtbarmachung des Kerns Färbung mit sehr verdünnten Lösungen von Gentianaviolett oder Methylenblau oder Methylviolett.

Härtung und Färbung der Hefezellen zwecks eingehenderer Untersuchung z. B. nach dem Verfahren von MÖLLER²: Einige Tropfen Jodjodkalilösung³ auf einem Objektträger mit einer Platinöse der zu untersuchenden Hefesuspension gleichmäßig vermischt und hiervon je eine Platinöse entnommen und auf

¹ Hinsichtlich Abbildungen für die mikroskopische Untersuchung der verschiedenen Gärungsorganismen vgl. insbesondere LINDNER (Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde, 6. Aufl., Berlin 1928) sowie GLAUBITZ (Atlas der Gärungsorganismen, Berlin: Parey 1934).

² MÖLLER: C. Bact. II, 12, 540 (1892); 14, 359 (1893).

³ 1 g Kaliumjodid in 100 ccm destilliertem Wasser mit Jod bis zur Sättigung versetzt.

ein gut entfettetes Deckglas (vgl. S. 54) aufgestrichen, etwa zehn derartige Proben nach dem Abtrocknen an der Luft in eine mit Jodjodkalilösung gefüllte Glasdose gebracht und mindestens 24 Stunden hier belassen. Deckgläser mit Wasser abgespült und allmählich in 30%igen, 80%igen, schließlich 95%igen Alkohol eingelegt (hier nun mindestens 2 Tage belassen), wobei die gelbe Jodfärbung verschwinden muß. Sodann Färbung mit Fuchsin¹, indem die Deckgläser in die in einem Uhrglas befindliche und erwärmte Lösung eingetaucht werden. Abspülung mit Wasser, das einige Prozent Schwefelsäure enthält (zur Beseitigung einer Überfärbung). Eventuell Nachbehandlung mit LÖFFLERScher Methylenblaulösung. Anfertigung von Dauerpräparaten.

b) **Preßhefe (obergärige Hefe)**. Benutzung der käuflichen Bäckerhefe. Untersuchung wie zuvor. Zellform im wesentlichen analog wie bei Bierhefe, manchmal etwas kleiner und rundlicher. Eiweiß weniger stark gekörnt, Vakuole daher undeutlicher. Sproßverbände meist gut ausgebildet, fest zusammenhängend; Zellen gerade Linien in den Verbänden bildend. Neben den Preßhefezellen sind auch noch andere Organismen vorhanden, und zwar zumeist Torulaarten, ferner auch Kahmhefe (*Mycoderma*), selten *Exiguus*- und *Apiculatus*hefen². Alle diese Hefen sind in der Regel kleiner als die Kulturhefen und haben auch andere Form. Als Infektionen der Preßhefe können weiterhin Bakterien auftreten, und zwar sogenannte „wilde“ Milchsäurebakterien, wie *Lactobacillus BEIJERINCKII* („Kettenmilchsäurebacterium“) und Flockenmilchsäurebakterien. Da der Gehalt an Fremdorganismen in der Preßhefe manchmal gering ist, führt die unmittelbare mikroskopische Untersuchung vielfach nicht zum Ziele. Auf die Anwesenheit von Fremdorganismen muß dann mit Hilfe der Tröpfchen- oder Strichkultur nach LINDNER geprüft werden (vgl. S. 46).

Prüfung auf lebende und tote Hefezellen durch Zählung (mittels einer Zählkammer usw.) nach Färbung des Präparates mit Methylenblau oder Fuchsin, wobei die toten Zellen intensiv den Farbstoff aufnehmen.

¹ 4 g Fuchsin, 10 g Phenol, 40 ccm Alkohol in 200 ccm Wasser.

² Diese fremden („wilden“) Hefen können wegen ihres außerordentlich starken Vermehrungsvermögens manchmal über 80% der Preßhefe ausmachen. Da sie nur schwaches oder kein Gärvermögen besitzen, hat dann eine derartige Hefe keine ausreichende Triebkraft. Von Wichtigkeit ist ferner der Nachweis von untergäriger Bierhefe in der Preßhefe, da die erstere für Backzwecke wenig oder nicht geeignet ist (vgl. hierüber sowie über alle sonstigen eingehenden Prüfungen: HENNEBERG: Hdb. d. Gärungs bakteriologie, 1. Bd., S. 147 ff.).

c) **Weinhefe.** Untersuchung eines im Handel befindlichen Weinhefepräparates. Größe und Form der Zellen verschieden, meist elliptisch (Sacch. ellipsoideus); meist kleiner als die Bierhefe. Beachtung der Größe und Anzahl der Vakuolen (wegen hellerem Plasma meist weniger deutlich wahrnehmbar). Anlegung von Tröpfchen- oder Strichkulturen zur genaueren mikroskopischen Untersuchung.

2. Übung:

Züchtung der Hefe.

a) **Hefezüchtung nach dem System der natürlichen Reinzucht** (praktische Anwendung der auf S. 45 geschilderten Methode). Man gewinnt dabei keine absolute Hefereinkultur, wohl aber mehrere gleichartige Hefen. Die „Reinigung“ der Anstellhefe und der gärenden Hefen in Spiritusbrennereien und Hefefabriken wird vor allem mit Hilfe von Giften und durch sogenannte „Reinigungsgärungen“ unter bestimmten Bedingungen vorgenommen. Es handelt sich dabei vor allem um die Ausschaltung der wilden Milchsäurebakterien, von Essigbakterien, butylogenen Bakterien, der Kahlhefe und Torulahefe (geringe Gärkraft, aber starkes Vermehrungsvermögen), von Oidien und Penicillien¹.

„*Reinigungsgärung*“ von käuflicher Bäckerhefe. 10 g Preßhefe werden mit etwa 20 ccm Wasser und 20 ccm unverdünnter, süßer Bierwürze angerührt und dann so viel Schwefelsäure zugesetzt, daß der Säuregrad 2 erreicht wird (das sind 2 ccm n-Lauge für 100 ccm Lösung). Nach etwa einstündiger Gärung sind die meisten Hefeschädlinge abgetötet oder stark geschädigt, während die Hefe nicht gehemmt wird. Diese wird durch Absaugen oder Zentrifugieren wiedergewonnen und der gleiche Vorgang nochmals wiederholt. Mit der so gereinigten Hefeprobe können dann normale Vergärungen vorgenommen werden (vgl. Übungsbeispiel 7).

In der Praxis werden vor allem Schwefelsäure und Milchsäure verwendet, wenn auch viele andere Säuren den gleichen Effekt haben. Dabei wird fast niemals eine völlig bakterienfreie Gärung angestrebt, sondern es kommt in erster Linie auf eine Entwicklungshemmung der Begleitorganismen an.

Anwendung der zur Fernhaltung von Infektionen in der Praxis viel benützten Milchsäure. Beim Luftheferverfahren: Säuregrad der gesamten Würze im Gärbottich 0,3–0,45⁰ (= 0,13–0,2% Milchsäure);

¹ Näheres vgl. HENNEBERG: Hdb. d. Gärungsbakteriologie 1. Bd., S. 340, Berlin: Parey 1926.

sobald eine Infektion durch Flockenmilchsäurebakterien eintritt, muß die Würze auf mindestens 0,5^o angesäuert werden (Zusatz von 0,024 % Schwefelsäure = 0,1^o). Bei der Kartoffelbrennerei: Ansäuerung auf 1,6—2^o (etwa 0,7—0,9 % Milchsäure).

b) Hefezüchtung nach dem System der absoluten Reinzucht (praktische Anwendung der auf S. 45 ff. geschilderten Methoden). Z. B. Hefereinzüchtung mittels der Federstrichkultur (Tröpfchenkultur)¹.

Eine ganz kleine Hefemenge (Bierhefe oder Bäckerhefe usw.) wird mittels der Platinnadel in ein kleines Fläschchen mit 5—10ccm Würze (von 8^o Bllg.) gebracht und in dieser durch Umschwenken der Platinnadel gut verteilt; dann werden mittels einer sterilen Feder (vgl. S. 46) einige kleine Tröpfchen auf dem Deckgläschen angelegt und dieses über der Höhlung eines Objektträgers mikroskopisch untersucht (Vergrößerung etwa 400—500fach). Falls etwa 10 Zellen in jedem Tröpfchen vorhanden sind, muß die Würze mit der Hefeprobe zehnfach verdünnt werden, indem z. B. 1 Tropfen der Hefesuspension mit 10 Tropfen steriler, klarer Würze verdünnt wird; die mikroskopische Kontrolle (wie zuvor) ergibt, ob nun der richtige Verdünnungsgrad erreicht ist (0—3 Hefezellen im Tropfen) Anlegung des endgültigen Präparates, indem nun mittels der sterilen Feder drei Reihen kleiner flacher Tröpfchen (etwa 4—5 in jeder Reihe) auf das Deckgläschen aufgetragen werden. Auflegen des Deckgläschens auf einen hohlen Objektträger, Dichtung mittels des Vaselineinges, Prüfung im Mikroskop, Bezeichnung jener Tröpfchen, die nur eine Hefezelle enthalten (oben auf dem Deckgläschen mittels eines Tintenpunktes). Nach 24stündigem Verweilen im Brutschrank bei 25—30^o erfolgt die mikroskopische Prüfung der Reinheit und Einheitlichkeit. Nach 2—3 Tagen wird die Abimpfung von einem bezeichneten und überprüften Tröpfchen vorgenommen, und zwar mittels eines sterilen Filtrierpapierstückchens und einer Pinzette durch Einwerfen in sterile Würze oder Einimpfung in Würzeagar. Gegebenenfalls wird der ganze Prozeß wiederholt.

Die Fortzüchtung der Hefe kann auf Bierwürzeagar erfolgen, der für die verschiedensten Hefearten (auch Torulahefen usw.) gut geeignet ist. Auch das Gärvermögen der Hefen bleibt dabei erhalten. Eine Erhöhung des Gärvermögens soll durch Einimpfen der Hefe in Zuckerrohrsafft erzielbar sein².

c) Hefezüchtung in PASTEUR-Kolben. Entwicklung von Reinzuchthefer in einem kleinen PASTEUR-Kolben (vgl.

¹ Vgl. HENNEBERG: Hdb. d. Gärungsbakteriologie, Bd. 1, S. 87.

² Vgl. YAMAFUJI, OHTSU und IWATA: Bio. Z. 296, 289 (1938).

S. 28): Im Kolben befinden sich etwa 100 ccm Bierwürze (von 8° Bllg.); in diese wird von einem Agarröhrchen mittels einer Platinnadel unter sterilen Bedingungen durch den seitlichen Ansatz des PASTEUR-Kolbens etwas Hefe eingimpft. Nachdem Entwicklung der Hefe bei 28—30° stattgefunden hat (nach etwa 1—2 Tagen) wird mit der Lüftung begonnen: Der Glasstöpsel im Schlauch des seitlichen Ansatzes wird gegen ein steriles Wattefilter unter sterilen Bedingungen ausgetauscht und mittels der Druckluftleitung (oder mittels eines Wasserstrahlgebläses) Luft in den Kolben über die Flüssigkeit geleitet (etwa je 5 Minuten). Zeitweise wird die Lüftung unterbrochen und kräftig geschüttelt; sobald sich der Schaum abgesetzt hat, wird mit der Lüftung fortgesetzt. Dieser Prozeß wird in Intervallen von etwa je 2 Stunden während der weiteren Zeit wiederholt. Nach einigen Tagen kann die Hefe in einen größeren PASTEUR-Kolben überführt werden.

Übertragung der Hefe in einen größeren PASTEUR-Kolben: Aus dem kleinen PASTEUR-Kolben wird die überstehende Würze unter Benutzung des Luftfilters nach dem Neigen des Kolbens durch das Schwanenhalsrohr unter sterilen Bedingungen herausgeblasen. Durch vorsichtiges Schütteln während dieses Vorganges entfernt man die lockere braune Schicht, die sich über der eigentlichen Kernhefe befindet (Entfernung abgestorbener oder weniger kräftiger Hefezellen). Überspülung der Hefe aus dem kleinen in den großen PASTEUR-Kolben (von 2 l Inhalt mit 1 l Würze von 8° Bllg.): Die Impfstutzen der beiden Kolben werden unter sterilen Bedingungen mittels eines Schlauches verbunden (links befindet sich der Kolben mit der Hefe, rechts der Kolben mit der sterilen Würze). Durch Neigen des rechten Kolbens läßt man etwas Würze in den linken Kolben laufen, schwemmt hier die Hefe durch Schütteln auf und spült sie dann in den rechten Kolben über; dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis die gesamte Hefe in den rechten Kolben überführt ist. Dann werden die Kolben wieder unter sterilen Bedingungen voneinander getrennt und der größere Kolben mit der Hefe in den Thermostaten gestellt. Sobald hier die Gärung beginnt wird der Glasstöpsel am Schlauch des Impfstutzens wieder gegen das Wattefilter vertauscht und in der oben beschriebenen Weise die Lüftung vorgenommen. Die gärende Würze kann nach einigen weiteren Stunden in einen kleinen kupfernen Reinzuchtapparat mit 5—6 l Würze eingimpft werden.

3. Übung.

Prüfung von Wuchsstoffwirkungen bei Hefe.

Nachweis des Wuchsstoffgehaltes in Bierwürze und Hefeextrakt¹. Man verwendet eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung: 10% Rohrzucker, 0,06% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,07% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05% NaCl , 0,04% CaCl_2 , 0,0005% FeCl_3 ($\text{pH} = 4,8$). Sodann werden 39 100 ccm ERLÉNMEYER-Kolben trocken sterilisiert. In 12 Kolben fügt man nun je 1 ccm Bierwürze von 10^0 Bllg., in weitere 12 Kolben je 1 ccm Hefeextrakt (15 g Bäckerhefe durch Auswaschen mit Wasser auf der Zentrifuge gereinigt, dann in 100 ccm Wasser aufgeschlämmt, 10—20 Minuten lang gekocht, wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht und abzentrifugiert). Die restlichen ERLÉNMEYER-Kolben dienen für Kontrollproben. Die Impfhefe wird etwa eine Woche in der gleichen Nährlösung, die noch 1% Bierwürze enthält, bei etwa 25^0 wachsen gelassen, dann durch Zentrifugieren gewonnen und durch wiederholtes Aufschlämmen in der Nährlösung und Zentrifugieren gereinigt. Nun werden in 21 steriler Nährlösung rund 0,16—0,20 g der vorbereiteten Frischhefe aufgeschlämmt. Man füllt je 50 ccm der Suspension mittels einer automatischen Pipette in die Kolben. Ermittlung der Hefetrockensubstanz in 3 Kolben (zur Bestimmung des Durchschnittes): Filtration der Suspension durch ein Jenaer Glasfilter (1 G 4), wiederholtes Auswaschen mit destilliertem Wasser, Trocknen bei 105^0 bis zur Gewichtskonstanz. — Stehenlassen der mit Watte verschlossenen Kolben bei 25^0 . Täglicher Abbruch von je 3 Kolben der 3 Gruppen und Bestimmung der Hefetrockensubstanz wie oben. Ermittlung des Quotienten der Hefetrockensubstanz in Milligramm in den Versuchen mit und ohne Zusatz von Wuchsstoff.

Während bei Verwendung einer geeigneten Hefe in wuchsstofffreiem Medium so gut wie kein Hefewachstum stattfindet, ist die Vermehrung bei Zusatz der Wuchsstofflösungen beträchtlich und steigt mit der Versuchsdauer an (auf das 20- bis 30fache). Die Methode ermöglicht auch die Bestimmung des Wuchsstoffbedarfes verschiedener Hefen. — Nach KÖGL arbeitet man mit einer Hefesuspension, die 0,24 mg Hefe enthält (etwa 3 Millionen Zellen), und mißt die Wachstumswirkung durch Bestimmung der Anzahl der Zellen in einer Zählkammer oder auf nephelometrischem Weg. Unter Saccharomyces-Einheit (SE.) versteht KÖGL jene Wuchsstoffmenge, die einem Zellzuwachs von 100% entspricht (unter bestimmten Versuchsbedingungen).

¹ Vgl. N. NIELSSEN: C. r. de trav. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol. **21**, 151 (1935).

Anhang: Theoretisches.

a) **Wuchsstoffe der Biosgruppe**¹. Dieselben fördern die Zellteilung der Hefe. Während jedoch die meisten wilden Hefen (Torulaarten usw.) sich die Biosstoffe selbst aufbauen, sind die Kulturhefen (oder Oidien u. a.) in synthetischen Nährlösungen auf die Zufuhr derselben angewiesen (COPPING, 1929). Die Biosstoffe stellen daher im ersten Fall Phytohormone, im zweiten Phytovitamine dar.

Bios I wurde als *meso-Inosit* erkannt und aus Teestaub² wie aus Hefe (KÖGL, 1935) isoliert. Die Spezifität desselben ist sehr eng begrenzt, denn andere Cyclite sind unwirksam (LASH MILLER 1930, KÖGL 1936).

Bios II (Biotin) wurde kristallisiert erhalten und erwies sich als N- und S-haltiger Körper (KÖGL und TÖNIS 1935, KÖGL 1937). Vorkommen: In Hefe (720 000 SE./kg), Reiskleie (467 000 SE./kg), Eidotter (3,7 Millionen SE./kg) usw.³ Im normalen menschlichen Harn werden etwa 10 γ pro Tag ausgeschieden (KÖGL). Die Wirksamkeit von 1 g Biotin entspricht 25–30 Milliarden SE. 1 mg kristallisierte Biotin in 400 000 l Nährlösung zeigt noch deutlichen Effekt.

Bios III enthält als wirksame Faktoren β -Alanin⁴ und l-Leucin, deren gemeinsame Wirkung stärker ist als die Summe der Einzelwirkungen. β -Alanin wirkt auch zusammen mit meso-Inosit oder Asparaginsäure oder Biotin; z. B. in folgendem Mischungsverhältnis: (LASH MILLER) pro Kubikzentimeter: 40 γ Inosit, 20 γ Biotin, 0,048 γ β -Alanin und 30 γ l-Leucin. Nach NIELSEN und HARTELIUS⁵ wirken auch noch andere Aminosäuren (die nicht oder nur schwer assimilierbar sind) als Wuchsstoffe, und zwar ist die Wirkung von ähnlicher Größenordnung; pro Kubikzentimeter: 25 γ Lysin, 50 γ Arginin, 100 γ Glutaminsäure. Diese Aminosäuren wirken nur, wenn gleichzeitig mehrere von ihnen vorhanden sind, einzeln zugesetzt erwiesen sie sich sogar als giftig.

Damit ist die Anzahl der Biosstoffe aber bestimmt noch nicht erschöpft, so wurde auch noch ein Bios V angenommen (in Hefewasser, Tomatensaft usw.), das bei manchen Mikroorganismen wirksam sein soll. Ferner sei auf die durch Pilze produzierte Wuchsstoffe hingewiesen. So soll das durch *Rhizopus sunis* gebildete Rhizopin im wesentlichen mit β -Indoylessigsäure identisch sein⁶. Dagegen ist die angebliche Wirkung verschiedener tierischer Hormone auf die Beschleunigung des Wachstums oder anderer Stoffwechselprozesse von

¹ Vgl. dazu auch KÖGL: B. 68, A 16 (1935). — Naturw. 23, 839 (1935).

² EASTCOTT: J. physiol. Chem. 32, 1094 (1928).

³ Zur Gewinnung von Bios II ist auch die bei der Zuckerraffinierung anfallende Tierkohle gut geeignet; vgl. LASH MILLER: Trans. Roy. Soc. Canada, Sect III (3) 31, 159 (1937).

⁴ Vgl. LASH MILLER: Trans. R. Soc. Canada, Ser. III Sect. 3, 30, 99 (1936). — WILLIAMS und ROHRMANN: J. Am. Chem. Soc. 58, 695 (1936). — Das Wachstum von *Aspergillus niger* wird dagegen durch β -Alanin nicht beeinflusst; vgl. NIELSEN und HARTELIUS: Bio. Z. 296, 171 (1938). Von Interesse ist auch, daß das β -Alanin in der Natur nur selten vorkommt (in Form der Dipeptide Carnosin und Anserin in der Muskulatur). Es entsteht wahrscheinlich durch Decarboxylierung von Asparaginsäure.

⁵ NIELSEN und HARTELIUS: Bio. Z. 295, 211 (1938).

⁶ K. THIMANN: J. Biol. Chem. 109, 278 (1935).

Mikroorganismen wahrscheinlich auf Verunreinigungen in den verwendeten Präparaten zurückzuführen.

Nach KÖGL erwiesen sich (bei der verwendeten Testhefe Bios I und Bios III für sich allein als unwirksam. Dagegen wurde durch gleichzeitige Anwesenheit von Bios I und III die Wirksamkeit von II aufs Doppelte erhöht. Die beiden erstgenannten wirken daher als Co-Wuchsstoffe. — Verschiedene Heferassen verhalten sich gegenüber den Biospräparaten sehr verschieden¹. — Es konnte auch ein gewisser Einfluß von $MgSO_4$ auf die Bioswirkung nachgewiesen werden. Je nach der verwendeten Heferasse erfolgte die Einwirkung in positivem oder negativem Sinne². Von Interesse ist weiterhin, daß durch die Biostoffe der N-Stoffwechsel der Hefe anscheinend geregelt wird (N-Abgabe ins Medium³).

b) Die Wachstumsfaktoren der Vitamin B-Gruppe stehen den Wirkstoffen der Biosgruppe nahe. So zeigt das Vitamin B_1 (Aneurin) bei bestimmten Heferassen Bioswirkung (WILLIAMS); und zwar fördert es die Biotinwirkung als „Co-Wuchsstoff“. Auch manche Pilze (Phycomycesarten und manche Mucorineen) wachsen auf künstlichem Nährboden nur in Gegenwart von Vitamin B_1 (BURGEFF und SCHOPFER⁴). Auch bei Bakterien wurden ähnliche Beobachtungen gemacht; z. B. *Staphylococcus aureus* braucht zu aerobem Wachstum Aneurin und Nicotinsäureamid (KNIGHT 1937), wobei der Methylester des Biotins verstärkend, also als Co-Wuchsstoff wirkt (KÖGL). Auch für das Wachstum mancher Arten von Dysenteriebacillen ist Nicotinsäure nötig. Verwandte Derivate können sie teilweise ersetzen⁵. — Vitamin B_2 (Lactoflavin) ist zum Wachstum von Hefe nicht erforderlich, wohl aber für die meisten Milchsäurebakterien (ORLA-JENSEN). Dagegen vermögen butylogene Bakterien aus Cerealien den Vitamin B_2 -Komplex in beträchtlicher Menge zu erzeugen⁶.

c) Anhang: Wachstumsstimulierung durch Spuren von Metallsalzen. Besonders die auffallende Wirkung des Zinks bei Pilzen ist gut bekannt. — Weiterhin ist von Interesse, daß man z. B. durch Erhitzen der Lösungen einiger Zuckerarten mit gewissen organischen Säuren oder deren Ammonsalzen einen Wachstumsfaktor erhält, der in Gegenwart von Filtrierpapierasche oder einer Mischung bestimmter Metallsalze (als „Co-Wuchsstoffe“) zur Wirkung kommt. Den Einzelmetallen fehlte dabei mit ganz wenigen Ausnahmen die Co-Wuchsstoffwirkung⁷.

¹ Vgl. LUCAS: J. Physiol. Chem. **28**, 1180 (1924). — WILLIAMS, WARNER und ROEHM: Am. Soc. **51**, 2764 (1929). — WILLIAMS und SAUNDERS: Bioch. J. **28**, 1887 (1934). — STANTIAL: Trans. Roy. Soc. Can. **26**, Sect. III, 163 (1932). — FARRAL: Ebenda **29**, Sect. III, 167 (1935).

² LESH, UNDERKOFER und FULMER: Am. Soc. **60**, 2505 (1938).

³ HARTELIUS: C. r. Lab. Carlsberg, Ser. physiol. **22**, 211 (1938).

⁴ Vgl. auch SCHOPFER und JUNG: C. r. hebdom. Séances Ac. Sci. **204**, 1500 (1937). KÖGL und FRIES: H. **249**, 93 (1937).

⁵ DORFMAN, KOSER und SAUNDERS: Am. Soc. **60**, 2004 (1938). — Für Hefe scheint jedoch Nicotinsäureamid kein Biosfaktor zu sein. SCHULTZ, ATKIN und FREY: Am. Soc. **60**, 1514 (1938).

⁶ J. YAMASAKY und W. YOSITOME: Bio. Z. **297**, 398 (1938).

⁷ NIELSEN und HARTELIUS: Bio. Z. **276**, 183 (1935).

4. Übung.

Erzeugung von Preßhefe.

Gewinnung von Backhefe aus Melasse nach dem Lüftungs- und Zulaufverfahren¹. Gewinnung der Stellhefe. Die erste Portion Hefe erzeugt man entweder gemäß Übung 2c oder in folgender Weise: Reinzuchthefer wird von einem Bierwürze-Agar-Röhrchen auf den gleichen, in einem oder mehreren 500 ccm-ROUX-Kolben befindlichen Nährboden übertragen und nach einigen Tagen bei 25—30° durch Abspülen geerntet. — Die so oder nach Übung 2c gewonnene Hefe wird als Impfmateriel zur Stellhefeerzeugung verwendet. 200 ccm einer Melassewürze von 10° Bllg. (geklärt und auf das p_H 5,6 eingestellt; Zuckergehalt etwa 6%) werden mit der wie erwähnt gewonnenen Hefe versetzt. Nach dem Vergären bei 28—30° (vgl. Übung 2c) fügt man zu je 100 ccm je 400 ccm sterile 10°-Bllg.-Melassewürze und belüftet schwach in zwei 1 l-KLUYVER-Kolben (vgl. S. 76). Sobald der Zucker verschwunden ist, fügt man den Inhalt jedes Kolbens zu je 500 ccm einer 6°-Bllg.-Melassewürze in 2 l-KLUYVER-Kolben und belüftet kräftig bis der Zucker verschwunden ist. Gewinnung der Hefe durch Zentrifugieren. Wiederholung des Prozesses, bis man eine genügende Menge Stellhefe hat. (Man kann auch von käuflicher Preßhefe ausgehen, die man zunächst einer „Reinigungsgärung“ unterwirft; vgl. Übung 2a).

Hauptversuch. Man benützt eine WOLFFSche Flasche von 20 l Inhalt, die mit Belüftungskerze und Tropftrichtern versehen ist (oder andere Belüftungsapparaturen gemäß den Abb. 19 und 20, S. 77/78)². Die mittels eines Wasserstrahlgebläses oder eines Kompressors erzeugte Druckluft wird durch einen Gasmesser (oder Strömungsmesser) und dann durch ein Wattefilter geleitet und tritt durch die poröse Filterkerze in feiner Verteilung durch die Flüssigkeit. Die Tropftrichter dienen zum Zulauf der Nährlösungen und der Würze. Die Apparatur wird mittels 80%igem Alkohol steril gemacht. Sodann füllt man 500 ccm 10°-Bllg.-Melassewürze ein (vgl. oben), die mit 7,5 l Leitungswasser verdünnt und dann sterilisiert worden war (p_H 5,2). Nun setzt man 80 g Stellhefe (mit etwa 25% Trockengewicht) zu, die mit einem

¹ In Anlehnung an BRAUN und PFUNDT: Bio. Z. 287, 115 (1936). — S. auch PFUNDT: Bio. Z. 291, 237 (1937); 294, 300 (1937).

² Für größere Versuche verwendet man z. B. einen etwas konischen Holzbottich von 80—100 l Inhalt und belüftet mit zwei miteinander durch ein Gabelrohr verbundene Belüftungskerzen. — Vgl. auch die von BRAUN und PFUNDT (l. c.) beschriebene Apparatur.

Teil der Würze angerührt wurde und belüftet 1 Stunde bei 25° (etwa 150 l Luft/Stunde). Innerhalb der weiteren 6—8 Stunden erfolgt der allmähliche Zulauf von 2250 ccm 10⁰-Bllg.-Würze vom p_H 5,6, sowie der Nährsalzlösungen durch die Tropftrichter bei voller Belüftung (300 l/Stunde). Die Nährsalzlösungen stellt man auf 2 g Stickstoff pro 100 ccm ein und verwendet eine etwa 9,4%ige (NH₄)₂SO₄-Lösung, 2,4%ige NH₃-Lösung und 9,4%ige (NH₄)₂HPO₄-Lösung. Während des Zulaufes steigert man die Temperatur auf 30°. Schließlich wird noch ½ Stunde voll und 2 Stunden halb belüftet. Der Zulauf der Würze wird in den einzelnen Stunden etwa folgendermaßen gestaffelt: 150, 250, 350, 500, 500, 500 ccm. Der Zulauf der N-Salze wird so geregelt, daß der p_H-Wert innerhalb der Grenzen 4—5 bleibt. Man benötigt etwa 120 ccm NH₃- und (NH₄)₂SO₄-Lösung, sowie etwa 60 ccm (NH₄)₂PO₄-Lösung. Die Staffelung erfolgt proportional dem Würzezulauf¹. — Sodann wird die Hefe abzentrifugiert, gewaschen, gepreßt (Feuchtigkeitsgehalt etwa 75—80%, sobald eine bröselige Masse vorhanden ist). Bestimmung der Ausbeute, Aufbewahrung im Eisschrank.

Verfolgung des Verlaufes der Hefezüchtung. Etwa stündliche Entnahme von Proben und Bestimmungen in diesen: p_H-Wert in üblicher Weise, ebenso Bllg.⁰. Ermittlung des Säuregrades durch Titration von 10 oder 20 ccm Probe mit n/10-Lauge.

Bestimmung der Hefeausbeute (bereits die Ermittlung der Bllg.⁰ der trüben Würze ergibt ein gewisses Bild): 50 ccm Probe werden über Kieselgur abgesaugt, gewaschen, gewogen (dann eventuell der Trockengehalt ermittelt). — Oder man zentrifugiert 10—20 ccm der Suspension in einem gewogenen Zentrifugierröhrchen, wäscht auf der Zentrifuge und trocknet dann 1 bis 2 Stunden bei 105°.

¹ Die Höhe des N-Bedarfes ergibt sich folgendermaßen: Aus 80 g Stellhefe (mit 25% Trockengewicht) können bei fünffacher Vermehrung 400 g entstehen. Zuwachs = 320 g Frischhefe (aus etwa 160 g Zucker, die in insgesamt 2750 ccm der angewendeten 10⁰-Bllg.-Würze enthalten sind). Die Frischhefe enthält im allgemeinen rund 2% N, also die entstandene Hefe 6,4 g. Nachdem in der angewendeten Melassewürze gegen 0,1% assimilierbarer N vorhanden sind, so entspricht dies etwa 2,7 g N. Demnach sind noch 3,7 g N zuzuführen, also rund 180 ccm Nährsalzlösung. — Der N-Gehalt von Melasse beträgt etwa 1,8—2% (davon 27% Betain-N, 30% Aminosäure- und Säureamid-N, 9% anorganischer N, 4% Eiweiß-N und 30% Rest-N). Durch die Klärung geht ein Teil des Stickstoffs in den Trub. Die 10⁰-Bllg.-Melassewürze enthält etwa 0,23% Gesamt-N und etwa 0,09—0,1% assimilierbaren N (rund 40% des ursprünglichen Melasse-Stickstoffs).

Biologische Kontrolle: Bestimmung der Hefevermehrung durch photoelektrische Trübungsmessung mit dem LANGE-Kolorimeter¹. — Bestimmung der Generationsdauer nach ALMOSLECHNER². — Mikroskopische Kontrolle und Bestimmung der knospenden und sprossenden Hefezellen³.

Alkoholbestimmung: Von 200 ccm ursprünglicher Lösung werden 100 ccm abdestilliert, nach eventueller nochmaliger Destillation (zur Anreicherung) wird der Alkoholgehalt pyknometrisch bestimmt. Die restliche Lösung wird wieder auf 200 ccm aufgefüllt und für andere Bestimmungen verwendet.

Ermittlung des Formolgrades (= ccm n-Lauge). 50 ccm Probe auf 100 ccm mit Wasser verdünnt, mit n/10-Lauge auf leichte Rötung titriert (Phenolphthalein). Zusatz von 10 ccm neutralisierter 40%iger Formalinlösung und nochmalige Titration auf Rot (1 ccm n/10-Lauge = 1,4 mg N).

Bestimmung des Restzuckers nach der Enteiweißung: 100 ccm Probe mit 3—5 ccm konzentrierter Bleiessiglösung versetzt, auf 200 ccm aufgefüllt. Nach gutem Umschütteln filtriert man und versetzt das Filtrat mit kalzinierter Soda, bis das Blei völlig gefällt ist. Nochmalige Filtration ergibt klare Lösung, in der die Zuckerbestimmung in üblicher Weise vorgenommen wird.

Ein ungefähres Bild über den chemisch-analytischen Verlauf der Hefezüchtung ergibt die Kurvenabbildung 22, die in einer Preßhefefabrik ermittelt wurde.

Untersuchung der Hefe⁴. Bestimmung der Trockensubstanz: 2—3 g Hefe werden am Boden eines flachen Wägegläschens, das beim Wägen mit einem Glasdeckel verschlossen wird, zu einer dünnen Schicht breitgedrückt und 4 Stunden bei 105—108^o getrocknet. Bestimmung des N-Gehaltes nach KJELDAHL; Modifikation von TÄUFEL und THALER⁵. Der N-Wert mit 6,25 multipliziert, gibt den Eiweißgehalt an (40—50% der Trockensub-

¹ LÜERS und Mitarbeiter: Z. f. Spiritusind. 2, 8 (1937). — Wirkungsweise des Instruments vgl. ENDERS: Wochenschr. f. Brauerei 26, 201 (1936). — Brauchbarkeit zur Hefemessung vgl. ENDERS und KÄRNBACH: ebenda 24, 185 (1934).

² ALMOSLECHNER: Planta 22, 515 (1934).

³ BRAUN und PFUNDT (l. c.) verstehen unter „Knospen“ jene Sprossungen, die auf höchstens $\frac{1}{5}$ der Größe der normalen Hefezelle herangewachsen sind, unter „Sprossen“ jene, die größer, aber noch mit der Mutterzelle verbunden sind.

⁴ Vgl. dazu E. ROSENBAUM: Z. f. Unt. d. Leb. 70, 366 (1935). — S. auch WENDEL: Kalender für Kornbrenner und Preßhefefabrikanten, Berlin 1930.

⁵ TÄUFEL und THALER: Angew. Chem. 48, 191 (1935).

stanz, bei Futterhefe höher). — Bestimmung der Triebkraft¹ nach KÜSSEROW (vgl. S. 109, Note 3) oder MEISSL. — Bestimmung der Gärzeit, beruhend auf der Zunahme des Teigvolumens. — Bestimmung der Haltbarkeit nach der Gläserprobe: Die Hefe wird in einem länglichen Glas festgepreßt und im Thermostaten bei 35° bis zum Weichwerden aufbewahrt (minde-

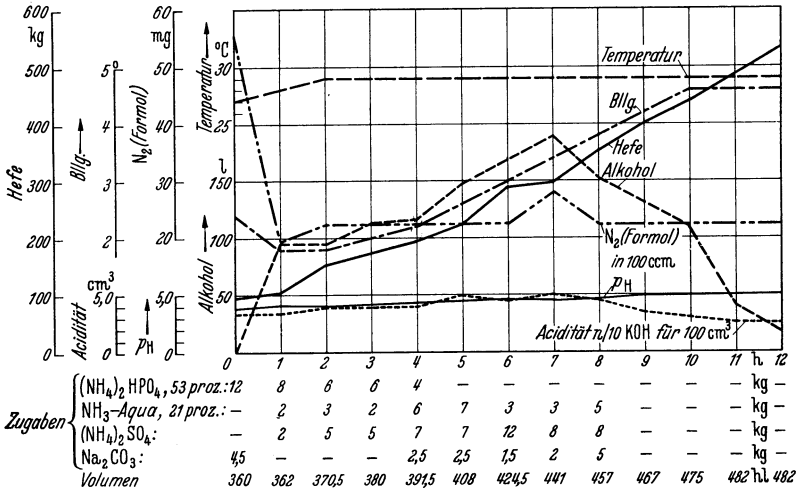


Abb. 22.

stens 96 Stunden soll die Hefe völlig haltbar sein). Schachtelprobe: Hefe-Pfundstücke in einer passenden Schachtel verschnürt, bei Zimmertemperatur aufbewahrt, sollen 6 Tage haltbar sein, ohne schmierig zu werden. — Biologische Reinheitsprüfung nach der Methode von LINDNER² (vgl. dazu Übung 1b).

Anhang: Zur Theorie und Praxis der Hefe- erzeugung.

1. Der Aufbau der Hefesubstanz bei der Preßheferzeugung (Backhefe sowie Futterhefe). Bei der Züchtung der Hefe nach dem Lüftungsverfahren sind grundsätzlich folgende Bedingungen von Wichtigkeit:

¹ Ein endgültiges Urteil über die Eignung der Hefe für Backzwecke läßt sich jedoch aus der Triebkraft nicht ableiten, da in der Zuckerlösung ganz andere Bedingungen vorhanden sind als im Teig.

² Vgl. dazu E. ROSENBAUM: Z. f. Unt. d. Leb. **70**, 366 (1935). — S. auch WENDEL: Kalender für Kornbrenner und Preßhefefabrikanten. Berlin 1930.

Anwendung überschüssiger Mengen von assimilierbaren N-haltigen Stoffen und Salzen, Einhaltung eines günstigen pH, Einführung größerer Mengen fein verteilter Luft in die Nährlösung und Anwendung des Zulaufverfahrens, also allmähliche Zuführung des Zuckers und der anderen Nährstoffe, so daß die sprossenden und wachsenden Hefezellen in jedem Zeitraum nur so viel Zucker in der Lösung vorfinden, als sie in kurzer Zeit verbrauchen können. Die Hefe muß dann — wenn gemäß dem Gesetz des Minimums die anderen Nährstoffe stets im Überschuß vorhanden sind — möglichst viel Zucker zum Aufbau von Körpersubstanz verarbeiten, ohne den Zucker einfach vergären zu können. — Bei Hefen mit geringem Gärvermögen (wie *Torula*-Arten) kann auch von höheren Zuckerkonzentrationen ausgegangen werden. — Hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen Atmung und Vermehrungsfähigkeit der Hefe vgl. SZILVINYI¹.

Die *Zusammensetzung der Hefetrockensubstanz* geht aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle XV.

Hefesorte	Eiweiß	N-freie Stoffe	Asche
Normale Hefe n. dem Lüftungsverfahren .	50—55%	37—42%	8%
Extremfälle }	25—30%	65—70%	5%
	65%	26%	9%

Von den normalerweise vorhandenen etwa 37% N-freier Bestandteile sind etwa 15—20% Cellulosen, Hemicellulosen, Hefegummi u. a., 12—17% sind Glykogen und andere Kohlehydrate, dazu kommen noch 4—5% Fett (alles bezogen auf Trockensubstanz).

Ausbeute an Hefe. Bäckerhefen werden unter gleichzeitiger geringer Alkoholbildung erzeugt, da sie nur dann für ihren Verwendungszweck geeignet sind, bei Futterhefen wird nur eine eiweißreiche Hefe ohne weitere Ansprüche gefordert. Die Reinausbeute an Versandhefe (für Backzwecke) aus Melassewürze beträgt maximal 200 kg Frischhefe, entsprechend 50 kg Hefetrockensubstanz auf 100 kg Rohrzucker; meist schwankt die Ausbeute zwischen 155—190 kg Frischhefe (etwa 39 bis 47% an Trockensubstanz), wobei noch etwas Alkohol gebildet wird. Bei genaueren Berechnungen darf nicht nur auf Zucker bezogen werden, sondern auch auf die in der Melasse vorhandenen Aminosäuren. — In Modellzüchtungsversuchen mit *Torula*hefe erhielten FINK und KREBS² aus 100 g reiner Glucose und Nährsalzen 210 g Hefe (mit 25% Trockensubstanz) und 53,5 g CO₂ (neben nur 0,02 g Alkohol).

¹ SZILVINYI: Bio. Z. 291, 7 (1937).

² FINK: Vorratspflege u. Lebensmittelforsch. 1, 52 (1938). — KREBS: Diss. Berlin 1938.

*Entstehungsweise der Hefesubstanzen*¹. Nach CLAASSEN² kann beim Lufthefeverfahren nicht der Zucker als solcher zum Aufbau der Bestandteile des Hefekörpers dienen (mit Ausnahme des Glykogens), sondern derselbe muß erst anoxybiontisch (durch Gärung) und dann oxybiontisch (durch Atmung) abgebaut werden; dabei wird viel CO₂ ausgeschieden, so daß zum Aufbau von Eiweiß die doppelte Menge Zucker, von Polysacchariden und Fetten die 2,22fache Menge Zucker (Glucose) verbraucht wird. Nach CLAASSEN kann auch der Alkohol in Gegenwart der nötigen anorganischen Nährstoffe als C-Quelle dienen, doch findet dabei kaum eine Vermehrung der Hefezellen statt, sondern dieselben nehmen nur an Gewicht zu.

Während man also bisher annahm, daß bei der technischen Durchführung der Hefezüchtung vergärbare Hexosen oder doch vergärbare Zwischenprodukte vorhanden sein müssen, konnten neuerdings FINK und Mitarbeiter³ zeigen, daß auch andere einfache C-Verbindungen wie Milchsäure, Essigsäure, Alkohol usw. die Hexosen voll ersetzen können. Die dabei erhältliche Hefe hat normale Zusammensetzung. Ein Aufbau der verschiedenen Stoffklassen der Hefezelle (wie Kohlehydrate, Eiweiß, Lipide, Enzyme, Vitamine, Cytochrome, Porphyrine usw.) ist daher aus ganz einfachen Substanzen möglich. Dabei gaben 100 kg Essigsäure bis zu 176 kg Hefe (mit 25% Trockensubstanz), 100 kg Acetaldehyd bis zu 200 kg, 100 kg Alkohol bis zu 290 kg. — Auch andere Verbindungen erwiesen sich als geeignet, so Brenztraubensäure, Glycerin, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Oxalessigsäure usw., die also als Zwischenglieder beim Aufbau der Hefezelle in Frage kommen. Von Wichtigkeit für den Reaktionsmechanismus der biologischen Eiweißsynthese aus Kohlehydraten ist auch die „Abfangung“ von Acetaldehyd⁴.

2. Technologie der Preßheferzeugung. *Prinzip* beim Zulaufverfahren (Lufthefeverfahren. Lüftungsverfahren): Man beginnt mit einer für die Entwicklung der Hefe günstigen niedrigen Zucker- und Nährsalzkonzentration und hält diese im Ausmaße des Verbrauches bis zum Schluß des Prozesses aufrecht, so daß alle Hefegenerationen in gleicher Weise ernährt werden. Die zum Schluß separierte Würze soll so gut wie zucker- und N-frei sein.

Ausgangsmaterial: Zumeist Melasse. Vorbehandlung derselben: Auf etwa 15^o Bllg. verdünnt, Zusatz von Schwefelsäure, so daß Säuregrad 2 entsteht (2 cem n-NaOH auf 100 cem Lösung), Erwärmen auf 65^o ½—1 Stunde, mindestens 6 Stunden stehengelassen; abziehen: Klarmelasse.

Durchführung des Prozesses: Beginn mit 1/8 der Gesamtmelasse, verdünnt auf 1,5^o Bllg., Zusatz von 1/8 der erforderlichen Menge Ammonsulfat und Diammoniumphosphat und 15—20% der Gesamt-

¹ Eine zusammenfassende Darstellung der Theorien über den Aufbau der Zellsubstanz der Hefe findet sich bei H. FINK und J. KREBS: Bio. Z. 299, 1 (1938).

² CLAASSEN: Z. Ver. Dtsch. Zuckerind. 84, 713 (1934).

³ FINK, KREBS und LECHNER: Bio. Z. 290, 135 (1937). — DIETRICH: Brenner-Ztg. 55, 5 (1938). Vgl. die Zusammenfassung von FINK: Angew. Chem. 51, 475 (1938).

⁴ CLAASSEN: Z. Ver. Dtsch. Zuckerind. 84, 713 (1934).

melasse an Stellhefe. Säuregrad 0,15–0,20 (pH 4,7–4,8), Formolgrad 1–1,2; Temperatur 24–26° unter langsamem Anstieg auf 30°. Zeitweise Probeentnahme und Feststellung des Formolgrades, Säuregrades und pH. Zulauf der Melasse von der zweiten Stunde an. Zeigt der Formolgrad 0,12–0,2, so wird Ammonsulfat zugesetzt; falls dabei der pH-Wert unter 4,3–4,4 sinkt, so wird neben Ammonsulfat auch Diammonphosphat zugesetzt. Der Formolgrad soll zum Schluß nicht höher als 0,05–0,1 sein, NH₃ soll nicht mehr nachweisbar sein, pH soll bei 4,4 liegen. Alkoholanhäufung ist bei den modernen Verfahren ganz ausgeschaltet, wohl aber verläuft der Zuckerabbau auch hier über Alkohol (keine direkte Zuckerassimilation).

Abtrennung der Hefe: Zentrifugieren, gründliches Auswaschen der Salze. Untersuchung auf Eiweißgehalt, Haltbarkeit, Backkraft usw.

Gewinnung der Stellhefe in einem eigenen Prozeß, indem die Betriebshefe unter Benutzung von Klarmelasse stets wieder einer Regeneration unter genauer Kontrolle unterworfen wird.

3. Bedeutung und Verfahren der biologischen Eiweißsynthese (Futterheferzeugung)¹. Die Erzeugung eiweißreicher Hefe für Fütterungszwecke ist insbesondere für Deutschland zur Schließung der „Eiweißlücke“ von großer Bedeutung. Zunächst kommt hier vor allem die Verwertung der Bierhefe in Betracht, also deren Umwandlung in versand- und lagerfeste Trockenhefe für Nahrungs- und Futterzwecke (vgl. dazu S. 19 und Nachtrag) und sodann die direkte Erzeugung von Futterhefe mittels Wuchshefen (*Torula utilis*). Durchführung des Prozesses grundsätzlich analog wie bei der Backheferzeugung. Entscheidend ist die Verwendung möglichst billiger Ausgangsmaterialien (hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit vgl. S. 5). Demgemäß sind einige Verfahren beschrieben worden.

a) *Melasse* diente bei der Futterhefegewinnung nach dem sogenannten DELBRÜCK-Verfahren im Weltkrieg als Rohstoff. Kommt heute nicht mehr in Frage.

b) *Holzzucker.* Verfahren bestens ausgearbeitet, Ausbeute vorzüglich auch in technischem Maßstabe. Aus 100 kg Holztrockensubstanz erhält man 21,1 kg (SCHOLLER-Verfahren) bzw. 31,2 kg Hefetrockensubstanz (BERGIUS-Verfahren). Die praktische Verwertung scheidete bis jetzt noch an den relativ hohen Holzzuckerpreisen. Allerdings sollen jetzt in Deutschland etwa 80 000–100 000 t Holzzuckerhefe jährlich im Rahmen des Vierjahresplanes erzeugt werden.

c) *Sulfitablauge* steht bei der dauernd steigenden Zellstoffproduktion in immer größeren Mengen zur Verfügung und stellt den billigsten Rohstoff für die Gewinnung von Futterhefe vor. 1 cbm der unverdünnten Lauge (mit 2–2,5% ausnutzbaren Zucker) gibt 10–12 kg Hefetrockensubstanz. Anfall der Sulfitablauge in Deutschland heute bereits etwa 7 Millionen cbm (daher ausreichend für 76 000 t Trockenhefe). Dieses Ausgangsmaterial konnte bisher großtechnisch noch nicht für die Futterheferzeugung verwendet werden, da es für die Spiritusgewinnung noch dringend benötigt wird.

¹ Vgl. dazu die zusammenfassende Abhandlung von FINK: *Angew. Chem.* 51, 475 (1938). — Dort ausführliche Literaturangaben.

d) *Kartoffeln* könnten durch Umstellung der landwirtschaftlichen Kartoffelbrennereien zur Erzeugung von Futterhefe verwendet werden. Dabei kommen nach FINCK drei Verfahren in Betracht, und zwar entweder der bisherige brennereihliche Prozeß, der neben eiweißhaltiger Schlempe vornehmlich Spiritus liefert, oder das Eiweiß-Schlempe-Verfahren, das vornehmlich Eiweiß ergibt oder schließlich ein kombiniertes Verfahren. Je nach Bedarf könnte der eine oder andere Prozeß angewendet werden. Alle Verfahren haben sich im Großbetrieb bewährt, doch kommt auch das so erzeugte Eiweiß erheblich teurer als das der Sojabohne.

e) *Molke*. Dieselbe kommt dort als Ausgangsmaterial zur Erzeugung von Futterhefe in Frage, wo ein Milchüberschuß vorhanden ist und das Casein für andere industrielle Zwecke verwendet wird (z. B. zur Kunstfasererzeugung). Zum Ersatz der so verminderten Eiweißmenge kann die biologische Eiweißsynthese durch Futterheferzeugung aus Molke dienen. In Frage kommen dabei Milchhefen, wie besonders *Torula lactis* u. a. Die Hefeentwicklung erfolgt mit großer Intensität, da die Molke leicht verwertbar ist.

f) *Einfache Kohlenstoffverbindungen*. FINCK und Mitarbeiter konnten zeigen, daß z. B. Essigsäure oder Alkohol auch in Abwesenheit von Zucker durch Hefe vollständig zum Aufbau neuer Zellsubstanz verwendet werden können. Auch die Massenzüchtung von Hefe läßt sich so im Dauerbetrieb in technischem Maßstab durchführen. Die Ausgangsmaterialien für die Gewinnung von vollwertigem biologischem Eiweiß sind hier letzten Endes Kohle, Luft-Stickstoff, Düngesalze und Wasser. Allerdings ist dieser von der Landwirtschaft unabhängige Weg der Eiweißherzeugung noch teurer als die oben behandelten Verfahren.

4. Die Hefe als Nahrungs- und Heilmittel¹. Die Hefebestandteile werden durch den Menschen vorzüglich ausgenutzt (Eiweiß zu 86%, Fett zu 70%, Kohlehydrate zu 100%). Vor allem die Umarbeitung von Bierhefe in wertvolle Produkte kommt hier zunächst in Betracht, und zwar besonders in Nährhefe und Hefeextrakt. Insbesondere zur Eiweißergänzung in der menschlichen Ernährung von Wichtigkeit sowie in entsprechender Zubereitung als Zugabe für Speisen. Hefeextrakt an Stelle von Fleischextrakt bestens geeignet (wegen des Vitaminreichtums demselben sogar überlegen).

Hefetherapie, heute noch in Entwicklung begriffen. Hefe ist besonders geeignet zur Beseitigung von Mangelgefahren und Mangelkrankungen wegen ihres Reichtums an Wirkstoffen (Vitamin B-Komplex, Provitamin D, insulinartige u. a. hormonartige Stoffe, Verdauungsfermente u. v. a.). — Die Hefe bleibt auch weiterhin eine Fundquelle für wichtige Wirkstoffe, die in der Heilkunde von Bedeutung werden können. (Vgl. auch Nachtrag.)

¹ Vgl. dazu SCHÜLEIN, Die Bierhefe als Heil-, Nähr- und Futtermittel, Dresden 1936. — WEITZEL und WINCKEL, Die Hefe, Berlin 1930. — STEPP, KÜHNAU und SCHROEDER, Die Vitamine und ihre klinische Anwendung, Stuttgart 1936.

5. Übung.

Fettsynthese durch Hefen und Oidien.

a) **Verfettung von Hefe** (nach HALDEN)¹. *Vorbehandlung der Hefe*: Untergärige Bierhefe wird 24 Stunden lang in frischer Bierwürze angären gelassen (etwa 1 Teil Hefe in 10 Teilen Bierwürze von 8° Bllg.), dann wird die Hefe abzentrifugiert (bzw. die Würze vorsichtig abgegossen), mit der gleichen Menge sterilen Leitungswassers geschüttelt, 24 Stunden stehen gelassen, dekantiert und der ganze Prozeß noch zweimal wiederholt. Schließlich wird die Hefe durch Zentrifugieren gewonnen.

Versuchsordnung: Einige große sterile PETRI-Schalen werden mit je 5 cm steriler, warmer 3½%iger Agarlösung mit 5% Zucker-

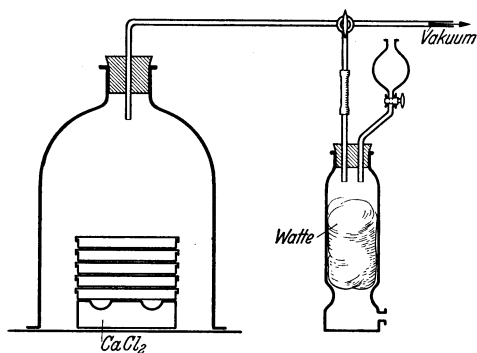


Abb. 23. Apparat zur Hefeverfettung.

gehalt beschickt, unter eine evakuierbare, durch Abreiben mit Alkohol entkeimte Glasglocke gestellt (vgl. Abb. 23). Dann wird mittels einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, nach längerer Zeit der Dreiweghahn mit dem Wattefilter verbunden, das mit etwas Alkohol mit Hilfe des Tropftrichters befeuchtet ist. Die Glocke

wird dann abgenommen und auf die Agarböden je 10 cm Hefesuspension (etwa 1 g der wie oben vorbehandelten, zentrifugierten Hefe verteilt in 0,15%iger Agarlösung) aufgetragen. Nach der Zusammenstellung der Apparatur und nach dem Einsetzen einer Schale mit gekörntem Chlorcalcium wird nun wieder evakuiert und filtrierte, mit Alkoholdampf beladene Luft eingelassen. Dieser Vorgang wird täglich zweimal wiederholt und das ganze bei ungefähr 20° stehen gelassen. — Etwa alle 4 Tage wird eine Schale entnommen und die Hefe näher untersucht und zwar:

Mikroskopische Untersuchung der Fett-hefe: 1 Tropfen der Hefesuspension wird auf einem Objektträger mit 1 Tropfen des Fettreagenzes versetzt: Sudanlösung (1 g Sudan III in 100 cm

¹ HALDEN: H. 225, 249 (1935); SOBOTKA, HALDEN und BILGER: H. 234, 1 (1935).

Alkohol) gibt orange-rote Färbung der Fettröpfchen; Osmiumsäure färbt das Fett braunschwarz, Alkannatinktur rot; α -Naphthol (1% in 1%iger Sodalösung) mit Dimethyl-p-phenylendiamin (1%ige wäßrige Lösung¹) gibt Blaufärbung.

Bestimmung des Gesamtlipoidgehaltes²: Gewinnung der Hefe aus den PETRI-Schalen durch Abstreifen mittels eines breiten Spatels, unter Abspülen der Gesamtoberfläche mit destilliertem Wasser. Die Hefe wird dann entweder zentrifugiert oder auf einem Glasfrittenfilter³ abgesaugt und ausgewaschen; Ermittlung des Feuchtgewichtes der Hefe durch Wägung. Bestimmung des Trockengewichtes durch Trocknen einer Probe in einem evakuierbaren Röhrenexsiccator bei 105—110° unter Durchleiten eines durch Chlorcalcium getrockneten Luftstromes. — Eine Probe der Feuchthefer wird dann zwecks Aufschließung des Zellmaterials der Autolyse unterworfen: Die Hefeprobe wird in einem verkürzten Reagensglas mit einigen Tropfen Toluol versetzt, unter kurzem Erwärmen auf dem Wasserbad mit einem Glaspistill verrieben und 24 Stunden stehen gelassen, wobei vollständige Verflüssigung eintritt. Nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator bei 40—60° wird die Probe in einer kleinen Reibschale vorsichtig verrieben, in einem Filterschälchen eingewogen und in einem Mikroextraktionsapparat mit Äther 1½—2 Stunden extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers im Vakuumexsiccator wird der Extrakt gewogen (Gesamtlipoide, auszudrücken in Prozenten der Trockenhefe).

Bestimmung des Steringehaltes⁴: Der wie beschrieben gewonnene Ätherextrakt wird in 5 ccm Benzol aufgenommen (gegebenenfalls noch mit Benzol auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und davon 5 ccm entnommen) und nun die LIEBERMANN-BURCHARDT-sche Reaktion durchgeführt: Zusatz einer Mischung von 2 ccm Essigsäureanhydrid und 6 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure unter Kühlung. Es entsteht eine rotviolette Färbung, die rasch in grün übergeht. Nach 2 Minuten bei 18° erfolgt der Vergleich im Colorimeter mit einer Lösung von Naphtholgrün B.

¹ In kleinen zugeschmolzenen Glasröhrchen vorrätig zu halten.

² Vgl. GORBACH: Mikrochem. 12, 161 (1933). — BILGER, HALDEN und ZACHERL: Mikrochem. 15, 119 (1934).

³ Nr 1, G 3/7, SCHOTT & Gen., Jena.

⁴ Vgl. HEIDUSCHKA und LINDNER: H. 181, 15 (1929). — BILGER, HALDEN und ZACHERL: Mikrochem. 15, 119 (1934). Hinsichtlich einer Farbskala zum colorimetrischen Vergleich siehe BERNHAUER und PATZELT: Biochem. Z. 280, 388 (1935).

b) Fettbildung durch Oidien (Oospora-Arten)¹. Einige 5 l FERNBACH-Kolben werden mit je 1 l Molke² (enthaltend etwa 3,5% Milchzucker) beschickt, die noch 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g KH_2PO_4 und 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält (pH 5,0) und nach dem Sterilisieren im Dampftopf (wobei noch das restliche Eiweiß ausfällt) mit einer Kultur eines geeigneten Stammes von *Oidium lactis* (*Oospora lactis*³) geimpft. Nach etwa 6 Tagen bei 27° ist das Wachstum beendet, der pH -Wert etwa 7,0⁴, der Fettgehalt hat seinen Höchstwert erreicht (später treten bereits autolytische Vorgänge ein). — Abbruch des Versuches: Sammlung der Pilzdecken, Auswaschen derselben, Trocknen bei 105° und Wägen.

Bestimmung des Fettgehaltes. Die trockene Substanz wird etwa 3 Stunden in der Kugelmühle pulverisiert, dann wird die gleiche Menge Quarzsand zugegeben und die Mühle noch $\frac{1}{4}$ Stunde laufen gelassen. Sodann extrahiert man 1 g Substanz (Quarzsand abgerechnet) im Extraktionsapparat von SCHMALFUSS⁵ etwa 6 Stunden mit Äther. Der Rückstand wird nun nochmals in der Kugelmühle kurz gemahlen, möglichst quantitativ daraus entfernt und wieder extrahiert. Eventuell muß der Prozeß nochmals wiederholt werden. Sobald nach 6stündiger Extraktion die erneuert gewonnene Fettmenge weniger als 0,3% beträgt, kann auf eine Weiterbehandlung verzichtet werden. Nach dem Abdestillieren des Äthers wird das Rohfett bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. (Hinsichtlich einer anderen Fettbestimmungsmethode vgl. Nachtrag.)

Anhang: Theoretisches.

1. Die Fettsynthese bei der Hefeverfettung. Der normale Fettgehalt der Hefe ist meist relativ gering (etwa 1–5% der Trockensubstanz), durch besondere Maßnahmen gelingt es jedoch, denselben um ein Vielfaches zu steigern (bis über 40%). Fettbildung findet insbesondere bei starkem Luftzutritt statt (also bei reichlicher Durch-

¹ In Anlehnung an FINK, HAESELER und SCHMIDT: Z. f. Spiritusindustrie 1937, Nr 11/12.

² In biosfreier synthetischer Nährlösung findet nur sehr mangelhaftes Wachstum statt.

³ Oidien mit einer schneeweißen, seidenglänzenden Decke sind schlechte Fettbildner, solche mit einer gelblich-weißen, hirnartig gewellten Haut gute.

⁴ Für *Oidium lactis* ist charakteristisch, daß es die Milchsäure der Molke völlig verzehrt, wodurch die Nährlösung alkalisch wird.

⁵ SCHMALFUSS: Chem. Fabr. 9, 161 (1936).

lüftung oder in Oberflächenkulturen¹). So sind die Hefen von Agar-kulturen (oder in Tröpfchenkulturen), sowie die Oberflächenzellen abgepreßter Hefemassen meist sehr fettreich (HENNEBERG). Ferner findet bei Einwirkung von Alkoholdämpfen auf Hefen (Brauerei- und Brennereihefen, in dünner Schicht aufgebracht) rasche Fettbildung statt (LINDNER und UNGER, 1917). Nach LINDNER² soll auch die in Oberflächenkulturen von Hefen beobachtete üppige Fettbildung hauptsächlich dem aus den tieferen Schichten aufsteigenden Alkohol seine Entstehung verdanken. Auch nach HALDEN³ ist für die Verfettung von Hefe die Behandlung der Kultur mit Alkoholdampf bei mäßiger Lüftung der ausschlaggebende Faktor; ausgelöst und gesteuert wird der Vorgang nach dem gleichen Autor durch den Wasserentzug. Bereits durch längeres Pressen von Hefe kann der Lipoidgehalt (und zwar besonders der Steringehalt) erhöht werden.

Betreffend den Chemismus der Fettsynthese aus Alkohol sei hier nur so viel bemerkt, daß die Fettsäureketten durch Kondensation von Acetaldehydmolekülen zu entstehen scheinen; vgl. dazu auch S. 134⁴. Hinsichtlich der Frage der Beteiligung von Polyenaldehyden an der Fettsynthese vgl. REICHEL⁵.

Physiologische Bedeutung der Fettbildung: Unter den Bedingungen bzw. im Stadium der Fettbildung (also besonders bei alten Hefezellen) findet keine weitere Vermehrung der Hefe statt. Derartige Zellen zeigen auch beim Einimpfen in frische Würze meist nur ein geringes oder kein Vermehrungsvermögen. Nach HENNEBERG wie auch nach LINDNER muß zwischen dem normalen „Reservefett“, das beim Hungern aufgebraucht wird, und dem „Degenerationsfett“, das sich in sehr großer Menge im Alter oder unter besonderen Bedingungen bei Luftzutritt ansammelt, unterschieden werden (vielleicht sind auch Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung vorhanden). HALDEN vergleicht die Fettbildung in Hefen unter dem Einfluß des Wasserentzuges mit der Fettbildung in den sogenannten Ölsamen der höheren Pflanzen oder im Holz und in der Rinde der sogenannten Fettbäume, Vorgänge, die auch bei abnehmendem Wassergehalt einsetzen.

2. Fettbildung durch andere Mikroorganismen⁶. Nicht nur Kulturhefen sind zur Fettbildung befähigt, sondern auch verschiedene andere Hefen, so besonders *Torula pulcherrima*⁷ sowie der hefeartige Fett-

¹ Im Gegensatz dazu bildet sich aber manchmal auch ohne Luftzutritt Fett, so z. B. im Bier- oder im Weinlagerfaß; dabei handelt es sich wohl um einen physiologisch andersartigen Vorgang.

² Vgl. LINDNER: Mikrosk. u. biol. Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 6. Aufl., S. 284, Berlin: Parey 1930.

³ HALDEN: H. 225, 249 (1935); SOBOTKA, HALDEN und BILGER: H. 234, 1 (1935).

⁴ Zusammenfassungen der diesbezüglichen Vorstellungen vgl. BERNHAUER: Fettstoffwechsel und Fettsynthese in SCHÖNFELD-HEFTER, Chemie u. Technologie der Fette Bd. 1, S. 384 (1936). — SMEDLEY-MAC LEAN: Die biochemische Fettsynthese aus Kohlenhydraten: Erg. d. Enzymforsch. Bd. 5, S. 285 (1936).

⁵ REICHEL: Ang. Ch. 51, 190 (1938).

⁶ Vgl. dazu die Literaturzusammenfassung von SCHWARTZ: Angew. Chem. 50, 294 (1937).

⁷ LINDNER: Angew. Chem. 35, 110 (1922).

pilz *Endomyces vernalis* (*Endomycopsis vernalis*), der besonders im Krieg für Untersuchungen über die Fettgewinnung herangezogen wurde¹. Sodann zeigte sich, daß auch eine sehr große Anzahl von *Aspergillus*- und *Penicillium*-arten Fett bilden, darunter das *Pen. javanicum* unter geeigneten Bedingungen sogar über 41% (im allgemeinen etwa 24% des Trockengewichtes)². In alten Pilzkulturen kommt es vielfach zu einer besonders starken Anhäufung von Fett. Dabei handelt es sich jedoch auch hier, ebenso wie bei Hefe (vgl. oben) um Degenerationsfett.

Mit der Fettbildung durch Oidien hat sich sodann FINK³ näher beschäftigt und insbesondere auf die große Widerstandsfähigkeit derselben gegenüber Infektionen und damit deren Eignung zur Züchtung in größerem Maßstab hingewiesen. Hinsichtlich der Ausbeute an Fett, bezogen auf Zucker, erwies sich ein bestimmter Stamm von *Oidium lactis* allen anderen Organismen überlegen. Bei der Kultur in Schalen betrug die Ausbeute an Rohfett, bezogen auf angewendeten Zucker: bei *Oidium lactis* 12–14% nach 5 Tagen, bei *Endomyces vernalis* 10% in der gleichen Zeit, bei *Pen. javanicum* nur gegen 3% nach 19 Tagen. Die Ausbeute an Trockensubstanz betrug vergleichsweise bei diesen Organismen 47–48%, 40–41% und 12–13%, war also auch bei *Oidium lactis* am höchsten. GEEFFERS⁴ erhielt durch *Oidium*-arten aus 1000 l Molke 3–5 kg Fett (bezogen auf den Milchzucker-gehalt also etwa 7,5–12,5%).

Jedenfalls tritt Fett so gut wie bei allen Pilzen als Zellinhaltsstoff auf, allerdings in sehr verschiedenem Ausmaße. Ebenso enthalten Bakterien vielfach reichliche Mengen Fett. Auch die Kieselalgen, die autotroph sind (also CO₂ assimilieren) lagern Fett in ihren Zellen ab; viele derselben lassen sich auch laboratoriumsmäßig kultivieren.

Hinsichtlich der Kulturbedingungen für eine kräftige Fettbildung dürfte stets eine reichliche C- und N-Nahrung bei guter Sauerstoffversorgung von Bedeutung sein. Bei mycelbildenden Pilzen ist auch das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen der Nährlösung von Wichtigkeit. Bei technischen Versuchen mit *Endomyces vernalis* führte weder das Schalen- noch das Tennenverfahren zum Ziel⁵. Bei Sproßpilzen arbeitet man zweckmäßigerweise unter Durchlüftung der Flüssigkeit. Zum Zwecke einer rationelleren Fettgewinnung müßte unbedingt auch die submerse Erzeugung des Pilzmycels angestrebt werden (vgl. S. 77). Nach GEEFFERS⁴ ist jedoch in submerser Kultur die Fettbildung gehemmt. Von entscheidender Bedeutung für die technische Fettgewinnung durch Mikroorganismen zu wirtschaftlich tragbaren Bedingungen ist sodann vor allem die Auffindung eines brauchbaren, entsprechend billigen Ausgangsmaterials (vgl. zu diesem Problem auch S. 19).

¹ HAEHN und KINTOFF: B. 61, 439 (1923); Chemie d. Zelle u. Gewebe 12, 115 (1926). — Über die im Krieg gemachten Erfahrungen mit *Endomyces vernalis* vgl. besonders FINK, HAEHN und HOERBURGER: Ztschr. f. Spiritusind. 61 (1938).

² WARD LOCKWOOD, MAY, HERRICK und O'NEILL: C. Bact. II, 90, 411 (1934). — Ind. Eng. Chem. 27, 318 (1935).

³ FINK, HAESLER und SCHMIDT: Z. f. Spiritusind. 1937, Nr 11/12.

⁴ GEEFFERS: Arch. Mikrobiol. 8, 66 (1937).

⁵ FINK, HAEHN und HOERBURGER: Forschungsdienst 5, 115 (1938).

6. Übung:

Herstellung von Hefezubereitungen.

a) **Lebende frische Hefe.** Die z. B. aus einer Brauerei frisch bezogene Hefe wird in einer Sedimentierzentrifuge abgeschleudert (oder auch abgesaugt), mit Wasser angerührt und nochmals zentrifugiert oder abgesaugt, Prozeß eventuell wiederholt; Hefe sodann in Wasser aufgeschlämmt und für Gäransätze verwendet. Bestimmung des Trockengewichtes aus der durch kräftiges Umschütteln homogenisierten Hefesuspension: 10 ccm abgesaugt und im Trockenschrank bei 105° bis zur Konstanz getrocknet.

b) **Lebende „verarmte“ Hefe.** Befreiung der Hefe von rasch veratembaren Inhaltsstoffen¹: Frische Hefe wie unter a gewaschen und zentrifugiert (bzw. abgepreßt), in der fünf bis zehnfachen Menge Leitungswasser suspendiert, in eine Flasche gefüllt, Luft durch Sauerstoff verdrängt, etwa 20 Stunden auf der Schüttelmaschine behandelt, sodann gegebenenfalls abgesaugt oder abzentrifugiert und in Wasser aufgeschlämmt, oder auch direkt für Gärversuche verwendet. Bestimmung des Trockengewichtes wie oben. Die Gewichtsabnahme beträgt rund 20% (es werden vor allem einfache und leicht hydrolysierbare Kohlehydrate entfernt).

c) **Trockenhefe**². Bierhefe, frisch von einer Brauerei bezogen, wird gründlich durch Dekantieren gewaschen, dann auf einem Tuch abtropfen gelassen, in ein Preßtuch eingeschlagen und in einer Handpresse oder in einer hydraulischen Presse (bei 50 at) abgepreßt, durch ein grobes Sieb getrieben, in lockerer, 1 bis 1,5 cm dicken Schicht auf Filtrierpapier ausgebreitet, 2 Tage bei 25—35° getrocknet. Zwecks Gewinnung eines gleichmäßigen Pulvers schließlich in einer Kaffeemühle fein gemahlen und schließlich etwa 24 Stunden in einer Kugelmühle pulverisiert und bei 0° aufbewahrt.

Das Präparat enthält noch lebende Hefezellen (Handelspräparate oft erhebliche Anteile), die in einem geeigneten Medium zur Entwicklung gelangen können. Vgl. Nachtrag. Gärungschemische Verwendung der Trockenhefe vgl. Übung 7c und 9b, insbesondere zur Herstellung von Macerationssaft.

d) **Aceton-Dauerhefe (Zymin)**³. 500 g ausgewaschene und abgepreßte Brauereihefe (wie zuvor) mit etwa 70% Wassergehalt wird grob gepulvert und innerhalb 3—4 Minuten mittels einer

¹ WIELAND und WILLE: A. 515, 260 (1935); vgl. auch WIELAND und CLAREN: A. 492, 183 (1932).

² v. LEBEDEV: Ann. Inst. Pasteur 26, 8 (1912). — Vgl. dazu NILSSON und ALM: H. 239, 179 (1936).

³ ALBERT, BUCHNER und RAPP: B. 35, 2376 (1902).

steifen Bürste durch ein Sieb (100 Maschen pro qcm) in eine flache Schale mit 3 l wasserfreiem Aceton gedrückt. 10 Minuten gut verrührt, 1—2 Minuten absitzen gelassen, Flüssigkeit möglichst weitgehend abgegossen, Hefe auf einem BÜCHNER-Trichter abgesaugt (gehärtetes Filter) und auf demselben möglichst gut abgepreßt. Rückstand in einer Schale mit 250 ccm Äther mit den Fingern gut durchgeknetet, nach 3 Minuten wieder abgesaugt. Feines, fast weißes Pulver. In dünner Schicht auf Filterpapier ausgebreitet, $\frac{1}{2}$ —1 Stunde Äther an der Luft verdunsten gelassen, dann 24 Stunden bei 37° getrocknet. Ausbeute etwa 30% der abgepreßten Hefe. Vorschrift ist genau einzuhalten; Produkt in einer geschlossenen Flasche aufzubewahren. Wassergehalt etwa 5,5—6,5%.

Das Präparat ist bei sorgfältiger Herstellung frei von lebenden Hefezellen, behält seine Fähigkeit zur Zuckervergärung mehrere Monate, verliert sie aber dann allmählich. Oberhefe gibt meist weniger aktive Produkte. Zur Gewinnung von Hexosephosphaten usw. geeignet.

e) **Macerationssaft**¹. 50 g Trockenhefe in einer Schale mit 150 ccm Wasser von 35° gründlich angeteigt, in einen Kolben von etwa 750 ccm Inhalt gespült und 2 Stunden bei 35° unter zeitweisem Umrühren stehen gelassen (starkes Schäumen, daher großer Kolben). Sodann wird der Saft durch Zentrifugieren gewonnen. 1 kg Trockenhefe liefert etwa 1200 ccm Saft. Statt 3 Teilen Wasser für 1 Teil Trockenhefe, können auch 4 Teile genommen werden².

B. Die alkoholische Gärung.

7. Übung:

Die alkoholische Gärung des Zuckers (erste Vergärungsform).

a) **Kleingärmethode im hohlen Objektträger** (von LINDNER³), insbesondere zur Prüfung der Gärfähigkeit verschiedener Zuckerarten geeignet. Man benutzt glykogenfrei gemachte Hefe (Stehenlassen von Hefe in sterilem Wasser, bis das Glykogen verschwunden ist, mikroskopische Kontrolle mit Jodlösung; es darf keine rotbraune Färbung mehr auftreten). Als Gärgefäß verwendet man einen hohlen Objektträger, dessen Höhlung nach dem Einfüllen der Gärprobe mit einem Deckgläschen bedeckt wird, das man

¹ V. LEBEDEV: H. 73, 447 (1911). — Ann. Inst. Pasteur 26, 8 (1912).

² MEYERHOF: Bio. Z. 273, 80 (1934).

³ Vgl. LINDNER: Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, S. 207 (1930).

dann mit einem Vaseline-Ring zur Dichtung versieht. Gärprobe: 1 oder 2 Tropfen sterilen Wassers oder Hefewassers werden mit der milchig fein verteilten Hefe vermischt und eine kleine Menge der zu untersuchenden Zuckerart mittels eines vorn etwas breit geklopften Platindrahtes zugesetzt. Die Höhlung des Objektträgers muß vollständig ausgefüllt sein und überschüssige Flüssigkeit ist mittels sterilen Filtrierpapiers abzusaugen. Die Probe wird bei 25° aufbewahrt und nach etwa 12 Stunden untersucht. Bei geringer Gärung zeigen sich (manchmal erst nach schwachem Anwärmen mittels einer Mikroflamme) zahlreiche kleine CO₂-Bläschen; bei lebhafter Vergärung wird die Höhlung des Objektträgers fast ganz von einer großen CO₂-Blase ausgefüllt, die sofort zusammenschrumpft, wenn man einige Tropfen Lauge zufließen läßt.

b) **Kleingärversuch im Gärröhrchen** (vgl. Abb. 24)¹, nur für qualitative Zwecke. Einfüllung der Hefeprobe, suspendiert in 1—10%iger Zuckerlösung in der Weise, daß der lange Schenkel des Gärröhrchens völlig gefüllt ist. Aufbewahrung bei 18—37°. Nach kurzer Zeit ist lebhaftere Gärung zu bemerken, Beobachtung der Gasentwicklung im geschlossenen Rohrteil. Modifizierte Gärröhrchen zur quantitativen Messung des Kohlendioxyds, z. B. zur Zuckerbestimmung mittels Saccharometern (z. B. das LOHNSTEINSche Präzisionsgärungssaccharometer, bei dem eine Skala direkt die Menge der vergorenen Glucose anzeigt). Hexosen geben 46,5% CO₂ (theoretisch 48,9%), 1 ccm CO₂ entspricht daher 4 mg Hexose (bezogen auf 0° und 760 mm Druck).²

c) **Gärversuch im Eudiometerrohr** (vgl. Abb. 25), zur quantitativen Bestimmung des entwickelten CO₂, z. B. zur Feststellung des Gärvermögens verschiedener Hefezubereitungen usw.³. Das Eudiometerrohr wird zunächst vollständig mit trockenem Quecksilber gefüllt und sodann werden durch den Hahn unter Senken der Birne 10—20 ccm des frisch bereiteten Gärgemisches eingeführt. Gärgemisch z. B.: 2%ige Zuckerlösung mit 2% gut suspendierter

¹ Modifizierte Form des Einhorn-Gärröhrchens von NORD und WHITE: Amer. Soc. 49, 2118 (1927) vgl. Abb. 24 b.

² Eine eingehende Untersuchung über die Brauchbarkeit der Gärmethode zur quantitativen Bestimmung von Hexosen wurde von MEYERHOF und SCHULZ: Biochem. Z. 287, 206 (1936) durchgeführt.

³ In ähnlicher Weise wird die Triebkraft von Bäckerhefe bestimmt, z. B. mittels des Apparates von HAYDUCK oder von KUSSEROW: Messung des über Wasser aufgefangenen CO₂-Volumens [vgl. LINDNER: Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, S. 288 (1930)]. Ferner kann die Gärkraft auch durch die Bestimmung des Gewichtsverlustes des Gäransatzes nach 24 Stunden bestimmt werden (Gärverschluss mit Schwefelsäure gefüllt).

Trockenhefe und 1—2% Toluol (eventuell noch Zusatz von frisch bereitetem Hefekochsaft¹) oder Macerationsaft mit 10% Zucker und 1—2% Toluol versetzt. Durchführung der Gärung bei 18 bis 37°. Quantitative Verfolgung der CO₂-Entwicklung durch Ablesung in Intervallen von etwa 1 Stunde (nach vorsichtigem Aufschütteln des Ansatzes) unter Gleichstellung des Quecksilberniveaus im Rohr und in der Birne. Beendigung des Versuches, sobald das Gasvolumen konstant ist. Eventuelle Austreibung von

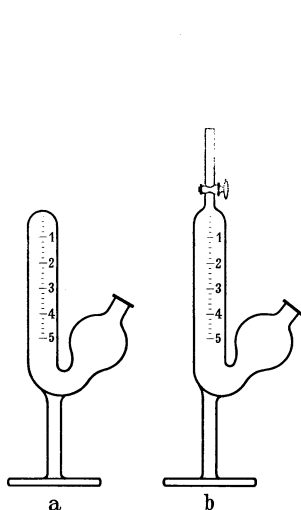


Abb. 24. Gärröhrchen.

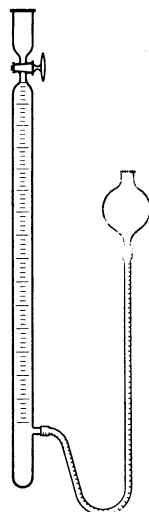


Abb. 25. Eudiometerrohr.

CO₂ aus der Lösung durch Zusatz von 1 oder 2 ccm verdünnter Schwefelsäure (durch den Hahn unter vorsichtigem Senken der Birne). Prüfung auf CO₂ (zugleich Überprüfung der Dichtigkeit des Hahnes) durch Einsaugen von etwa 10—20 ccm 50%iger Kalilauge, die sogleich das ganze Gas absorbieren muß.

Ermittlung des Gewichtes des CO₂-Volumens: $G = v_0 d$, $d(\text{CO}_2) = 1,9768 \text{ g/l}$ unter Normalbedingungen. Umrechnung des gefundenen Volumens auf Normalbedingungen gemäß der Gleichung

$$v_0 = \frac{v \cdot p \cdot 273}{(273 + t) 760}$$

bzw. mit Hilfe von Tabellen (vgl. Anhang II 1 d).

¹ Herstellung des Hefekochsaftes: 2 Teile frische Unterhefe mit 1 Teil Wasser gut vermischt, im siedenden Wasserbad unter öfterem Umrühren auf etwa 80° erhitzt und dann unter direkter Erhitzung kurz aufgeköcht. Sodann zentrifugiert oder filtriert.

Zum *Arbeiten unter sterilen Bedingungen* dient der Apparat von VAN ITERSON und KLUYVER¹.

Zur *Verfolgung des Gärverlaufes in Kleinversuchen* (mit 0,5—2 ccm Lösung) sei auf die von MYRBÄCK und v. EULER beschriebene *Mikromethodik der CO₂-Bestimmung* hingewiesen².

Zwecks *Verfolgung des Gärverlaufes in größeren Versuchen* dient ein modifiziertes Eudiometerrohr, das an Stelle des einfachen Hahnes einen Zweiweghahn (Schwanzhahn) besitzt (vgl. dazu Abb. 25), wodurch ein Ablassen des Gases in bestimmten Zeitintervallen ermöglicht wird; oben wird ein Gärkölbchen mittels eines zweimal rechtwinklig gebogenen Rohres und Gummistöpseln angeschlossen (sinngemäß in analoger Weise wie in Abb. 29). Gäransatz prinzipiell wie zuvor, aber mit etwa 50 ccm Lösung, die bei Gärtemperatur mit CO₂ gesättigt sein soll. Vor der Ablesung des Volumens wird das Gärgemisch kräftig geschüttelt. Durch Drehen des Hahnes und gleichzeitiges Heben der Birne wird sodann das Gas aus dem Schwanzhahn entweichen gelassen, und hierauf der Hahn wieder in normale Stellung gebracht.

Statt über Quecksilber kann das Gas auch über mit CO₂ gesättigtem Wasser aufgefangen werden (allerdings weniger genau); durch etwa ½stündiges Verweilen im Gärraum wird dabei zunächst überschüssiges CO₂ entfernt. Gegebenenfalls kann bei der Ablesung die Dampfspannung des Wassers berücksichtigt werden.

d) Gärversuch mit analytischer Bestimmung des Alkohols.
10 g Rohrzucker, 0,2 g (NH₄)₂SO₄, 0,1 g NH₂HPO₄, 0,025 g MgCl₂ · 6 H₂O, 0,025 g KCl in 100 ccm Wasser gelöst und in einem 200 ccm-Rundkolben mit 2 g gewaschener und abgepreßter Bierhefe (aufgeschlämmt in einem Teil der Lösung) versetzt, mit Gäraufsatz (vgl. Abb. 7, S. 73) verschlossen und bei 20—35° ausgären gelassen (Aufhören der CO₂-Entwicklung). Sodann mit Wasserdampf 100 ccm abdestilliert; und in Proben des Destillates wird der Alkohol qualitativ nachgewiesen sowie quantitativ bestimmt.

LIEBENSche Jodoformprobe: 2 ccm der Lösung auf 40—50° erwärmt, etwa 6 Tropfen 10%iger Kalilauge zugesetzt und Jod-Jodkali-Lösung bis zur Braunfärbung, dann mit Kalilauge entfärbt und erkalten gelassen: Jodoformgeruch bzw. Abscheidung von charakteristischen Jodoformkrystallen.

¹ Vgl. KLEIN: Hdb. d. Pflanzenanalyse IV, 1259 (1933). Wien: Julius Springer. (KOBEL und NEUBERG: Untersuchung von Gärflüssigkeiten.)

² Vgl. MYRBÄCK und v. EULER in OPPENHEIMER-PINCUSSEN: Methodik der Fermente, S. 1297. Leipzig: Thieme 1929.

*Nachweis als p-Nitro-Benzoesäure-Äthylester*¹. 20 ccm der Lösung werden mit Hilfe einer WIDMER-Kolonnen destilliert und der Alkohol angereichert; bei der ersten Destillation werden 10 ccm, bei der Destillation dieser Portion etwa 6 ccm aufgefangen, diese dann mit Pottasche versetzt und ausgeäthert. Der über geglühtem Natriumsulfat getrocknete ätherische Auszug wird mit absolutem Äther auf 20 ccm aufgefüllt und mit etwa 4 g p-Nitrobenzoylchlorid versetzt. Im Schliffkolben unter Rückfluß 24 Stunden zur Reaktion gebracht. Reaktionsflüssigkeit dann im Scheidetrichter mit n-Sodalösung gewaschen, bis die gesamte p-Nitro-Benzoesäure entfernt ist (beim Ansäuern des alkalischen Auszuges mit Salzsäure darf keine Trübung mehr eintreten). Ätherische Lösung dann über Natriumsulfat getrocknet, Äther im Vakuum verdampft. Rückstand aus Methanol und dann aus Petroläther umkristallisiert. Schmelzpunkt 57°.

Oxydation zu Acetaldehyd: 10 ccm der erhaltenen etwa 5%igen alkoholischen Lösung in einem 100 ccm-Rundkolben mit der berechneten Menge Kaliumbichromat (fein gepulvert; für 100 mg Alkohol etwa 220 mg Kaliumbichromat) und 5 ccm verdünnter Schwefelsäure (etwa 10%ig) versetzt, Kolben mit einem absteigenden Schlangenkühler verbunden, Vorlage mit Eis gekühlt. 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann langsam 10 ccm abdestilliert. Nachweis des Acetaldehyds im Destillat mittels Nitroprussidnatrium und Piperidin, Identifizierung als p-Nitrophenylhydrazon (vgl. S. 118).

Quantitative Bestimmung des Alkohols: Äthoxylbestimmung in üblicher Weise nach ZEISEL-FANTO (mit 1 ccm einer etwa 5%igen Lösung, etwa 50 mg Alkohol) oder durch Oxydation zu Essigsäure und Titration dieser im Destillat der Halbdistillation (vgl. Übung 25). Für viele Zwecke genügt auch die pyknometrische Bestimmung des Alkoholgehaltes im Destillat. Hinsichtlich einer Mikromethode zur Bestimmung des Alkohols vgl. MEYERHOF und KIESSLING² sowie FRIEDEMANN und KLAAS³.

e) **Präparativer Gärversuch**. Rundkolben von 10 l Inhalt mit 8 l einer 20%igen Rohrzuckerlösung (1600 g roher Zucker). Zusatz von 80 g gut ausgewaschener und abgepreßter Bierhefe (untergärer Hefe) nach gutem Anrühren mit einem Teil der Lösung. Mit Rückfluskkühler und großem Gärverschuß verbunden

¹ Vgl. MEISENHEIMER und SCHMIDT: A. 475, 157 (1929).

² MEYERHOF und KIESSLING: Biochem. Z. 267, 313 (1933); 281, 250 (1935).

³ FRIEDEMANN und KLAAS: J. Biol. Chem. 115, 47 (1936).

(vgl. Abb. 8, S. 73). In einem Gärraum bei 30—35° unter öfterem Umschütteln ausgären lassen. Entnahme einer kleinen Probe (2—5 ccm) und Feststellung, ob der Zucker verschwunden ist (bei positivem Ausfall nochmaliger Zusatz von etwa 40 g wie oben vorbereiteter Hefe und dann ausgären lassen).

Aufarbeitung: Destillation aus einem Luftbad (BABO-Trichter) unter Benützung einer WIDMER-Kolonne¹: 2000 ccm Destillat aufgefangen, sodann noch eine Fraktion von 100 ccm, Ermittlung des spezifischen Gewichtes ergibt ob noch erhebliche Alkoholmengen zurückgeblieben sind. Eventuell weitere Destillation. Vereinigte Kondensate aus analoger, aber kleinerer Apparatur nochmals übergetrieben und etwa 1000 ccm aufgefangen. Ermittlung des spezifischen Gewichtes im Destillat und Rückstand. Durch Wiederholung des Prozesses wird der Alkohol angereichert. Feststellung des Alkoholgehaltes im Destillat und Rückstand mittels eines Alkoholometers (Ermittlung des spezifischen Gewichtes).

Anhang I. Technologie der Spirituserzeugung.

a) Durchführung der Gärung. Vorgang je nach den Rohstoffen verschieden.

a) *Stärkehaltige Rohstoffe* (Kartoffel, Getreidearten, ferner Mais, Reis, Hirse, Buchweizen, Kastanien, Erbsen, Maniok, Topinambur usw.). Verzuckerung derselben mittels Diastase (Malz oder Pilze) oder durch Säurehydrolyse. Hefebereitung (obergärige Hefe) in der Regel nach dem System der natürlichen Reinzucht (vgl. S. 88). Vorbereitung der Rohstoffe: Reinigung, sodann Dämpfung (im Henze-Dämpfer, 30—45 Minuten bei $2\frac{1}{2}$ — $3\frac{1}{2}$ at, 138—147°) zwecks Stärkeverkleisterung. Die nachfolgende Verzuckerung im Vormaischbottich mit Malz (gequetschtes Grünmalz oder geschrotetes Darmmalz) wird als *Maischprozeß* bezeichnet (für 100 kg Kartoffeln etwa 2 kg Malz). Dieser wird bei 50—55°, zum Schluß bei 60—62° unter gutem Mischen durchgeführt. Entfernung der größten Anteile während des Überpumpens der Maische in den Gärbottich mittels des Entschalers. Gärung der Hauptmaische: Ansäuerung mittels *Lactobac. DELBRÜCKII* (20—24 Stunden bei 50° bis zum Säuregrad 2, entsprechend etwa 0,9% Milchsäure, Erhitzen auf 75°, dann Hefezusatz bei 30° (aus dem vorangehenden Ansatz); Angärung, Hauptgärung und Nachgärung. Hefevermehrung hauptsächlich während der Angärung; dieselbe kommt bald zum Stillstand (5% Alkohol wirken bereits hemmend). Kühlung während der Hauptgärung (28—29° sollen nicht überschritten werden). Gärdauer bei warmer Anstellung etwa 2 Tage.

¹ Ein Luftbad von besonderer Form zum Anheizen der Destillationskolben bei der Destillation von extraktreichen oder treberhaltigen Flüssigkeiten wurde von LAMPE und DEPLANQUE (Z. f. Spiritusindustrie 57, 322, 1934) beschrieben.

Zur Spiritusfabrikation dient in Deutschland hauptsächlich die Kartoffelbrennerei, dagegen die Kornbrennerei fast ausschließlich zur Branntweinerzeugung (vgl. unten).

Amyloverfahren (Stärkeverzuckerung durch Pilze): Meist in Mais- und Reisbrennereien. Mais wird nach dem Dämpfen im Gärbottich mit der Pilzkultur (*Mucorarten*) geimpft; bei 39° hat nach 25–30 Stunden bereits starke Pilzvermehrung und Verzuckerung stattgefunden. Nun wird mit Hefe geimpft und vergoren (Temperatur nicht über 38°). Dauer des ganzen Prozesses etwa 4 Tage. Größere Verbreitung des Amyloverfahrens hauptsächlich in Frankreich und Belgien, ferner in einigen Überseeländern.

β) *Zuckerhaltige Stoffe* (Zuckerrüben, Zuckerrohr, Melasse, zuckerhaltige Früchte und Pflanzenteile); direkte Vergärung. *Rübenbrennerei* (hauptsächlich in Frankreich und Ungarn): Benutzung der Zuckerrübensäfte (Herstellung wie bei der Zuckerfabrikation), Ansäuerung auf 0,16–0,18°, Konzentrierung auf 9–12° Bllg. Vergärung kontinuierlich, indem 1 Teil der vorhergehenden Maische zum Anstellen der nächsten verwendet wird. *Melassebrennerei*; Vorbereitung der Melasse (Verdünnen auf etwa 25–35° Bllg. entsprechend etwa 16° Zucker, Ansäuern mit Schwefelsäure auf etwa 0,3° und Kochen), Anstellen mit Hefe, Vergären. Verwendung der leistungsfähigeren, auch Raffinose vergärenden Weinhefen (statt der früher benutzten untergärigen Bierhefen). Zuckerrohrmelassen vergären schneller als Rübenmelassen.

γ) *Holzzucker*. Das Hauptproblem war hier die Überführung der Cellulose in Zucker: Anwendung hochprozentiger Salzsäure (BECHAMP 1856, WILLSTÄTTER und ZECHMEISTER 1914, HÄGLUND u. a.; Problem schließlich vor wenigen Jahren durch BERGIUS technisch gelöst). Die zunächst entstehenden polymeren Zucker werden sodann durch Erhitzen mit verdünnter Salzsäure vollständig hydrolysiert. 100 kg trockenes Holz geben 78 kg Trockenzucker mit einem Gehalt von 85% reduzierenden Kohlehydraten. (Bei der Aufschließung von Tannenholz entsteht ein Zuckergemisch von folgender Zusammensetzung: 61,9% Glucose, 24,7% Mannose, 4% Galaktose, 1,4% Fructose, 8% Xylose; vor allem die Xylose wird nicht vergoren.)

Bequemer ist das SCHOLLER-TORNESCH-Verfahren: Anwendung verdünnter Säure in Druckperkolatoren (0,4% Schwefelsäure bezogen auf das Gewicht des Holzes) bei 15 at. Überdruck und 170–180°. Direkte Vergärung der gewonnenen Zuckerrübe auf Spiritus. In Deutschland sind bereits fünf Großwerke gegründet, in Cleveland (Ohio, USA.) wurde ein Riesenwerk geschaffen, auch Japan hat das Verfahren erworben.

δ) *Alkoholerzeugung aus Sulfitablauge*. Fichtenholz enthält neben 30–39% Ligninsubstanzen, 50–53% Cellulose und 14–16% Kohlehydrate, die bei der Sulfitkochung jene Zuckermenge liefern, die vergoren wird. Vorbehandlung der Sulfitlauge (Neutralisierung mit CaO und CaCO₃). Wahl einer widerstandsfähigen Hefe (durch besondere Züchtung resistent gemacht; sehr gut bewährt sich die Rasse XII). Der Rohsprit enthält etwa 3% Methanol und etwas Acetaldehyd (infolge des Sulfits). 1 cbm Sulfitablauge liefert etwa 10 l 100%igen Alkohol. In den Jahren 1933/34 wurden in Deutschland aus über 5 Millionen Kubikmeter Ablauge über 456 hl 100%iger Spiritus hergestellt. Heute

werden bereits etwa 7 Millionen verarbeitet. — Da die zur Vergärung gelangende Sulfitablauge einen sehr niedrigen Zuckergehalt hat (1,5–2,5%) wurde der Zusatz von Holzzucker empfohlen, um so die durch die starke Verdünnung bedingten relativ hohen Kosten des Sulfitspiritus zu erniedrigen.

Alkoholerzeugung aus Torf; Aufschluß mit starker Schwefelsäure. Aus 1000 kg entwässertem Torf 50–60 l Alkohol. Rest gibt Briketts. Industrielle Verwertung noch nicht vorgenommen.

b) Destillation des Alkohols aus der vergorenen Maische (bei allen Verfahren). Anwendung einer Apparatur, die eine Rektifikation und Dephlegmation ermöglicht; man erhält so den Rohspiritus (Gehalt 50–80%, der einer Rektifizierung und Raffination in Kolonnenapparaten unterworfen wird, zur Entfernung von Beimengungen, unerwünschten Geruchs- und Geschmacksstoffen. Manchmal auch Filtration über aktive Kohle. Prüfung des rektifizierten Sprits auf Aldehyde, Furfurol, Säuren, Fuselöle usw. Herstellung von absolutem Alkohol (für dessen Verwendung als Kraftstoff) durch ein Destillationsverfahren mit Benzol (YOUNG 1902, später verbessert, z. B. v. KREUZLER, Druckdestillation usw.); zunächst geht ein azeotropes (ternäres) Gemisch der Komponenten über, bis alles Wasser entfernt ist, dann ein binäres Gemisch von Alkohol und Benzol, während wasserfreier Alkohol zurückbleibt.

Fuselöl: Etwa 0,4% im Rohspiritus; wird bei dessen Raffination (im Nachlauf) als Abfallprodukt gewonnen. Branntweine (durch nur einmalige Destillation gewonnen) haben meist einen ziemlich hohen Gehalt an Fuselölen, zum Teil in Esterform. Bestandteile des Fuselöls: 65–80% Amylalkohole (Isobutylcarbinol und sekundäres Butylcarbinol), 15–25% Isobutylalkohol, 4–7% n-Propylalkohol, ferner sehr geringe Mengen n-Butylalkohol, n-Amylalkohol, Hexyl- und Heptylalkohol, weiterhin Aldehyde wie Isobutyryl- und Valeraldehyd, Furfurol; auch Basen wie Derivate des Pyridins, Pyrazins und Piperazins und schließlich verschiedene Fettsäuren wie Ameisensäure, Essig-, Butter-, Valerian-, Capron- bis Caprinsäure, teils frei, teils in Esterform. Fuselöle und Ester tragen wesentlich zur Bildung des Gäraromas bei. Entstehungsweise der Fuselöle bei der Gärung vgl. S.117/118.

Anhang II: Erzeugung alkoholischer Getränke.

a) Bierbrauerei¹. *Ausgangsstoffe*: Gerste (von besonderer Qualität hinsichtlich Extraktgehalt und Keimfähigkeit), Hopfen (Fruchtstand, Träger der Aroma- und Bitterstoffe; Drüsensekret, Lupulin), Brauwasser (für helle, mittelprozentige, stärker gehopfte Biere, am besten ein weiches, salzarmes Wasser, z. B. beim Pilsner Bier filtriertes Flußwasser).

Phasen der Bierbereitung: 1. *Malzgewinnung* aus Gerste: Reinigung und Sortierung, Weichen in Quellstöcken unter planmäßiger Luftzuführung, Keimung (Herstellung des Grünmalzes) auf der Tenne oder in Keimapparaten (Mobilisierung und Bildung von Enzymen, besonders Diastase), Darren des Grünmalzes (Trocknen und Rösten desselben) unter allmählicher Erhöhung der Temperatur

¹ Vgl. das Kapitel über Bier von BLEYER und DIEMAIR im Hdb. f. Lebensmittelchemie, Bd. 7. Berlin: Julius Springer 1938.

(Wassergehalt sinkt von 40–45% auf 1–3%); Erzeugung von hellem oder dunklem Malz abhängig von der Temperatur (60° bzw. 100°). 2. *Würzbereitung*: Schrotten des Malzes, Maischung desselben unter intensivem Rühren (Temperatur allmählich bis auf 75–78°), dabei findet Extraktion und Stärkeverzuckerung (auch Eiweißabbau) statt; Entfernung der Treber im Läuterprozeß (Läuterbottich oder Maische-filter), Kochen der Würze mit Hopfen (dabei erfolgt auch Ausfällung gerinnbarer Eiweißstoffe, Konzentrierung und Sterilisierung), Filtration über den Hopfenseiher und Abkühlung im Kühlschiff (Absetzen der Eiweißstoffe, Phosphate usw. als Trub). 3. *Vergärung der Würze*¹: Besonders durch Untergärung; Hefezusatz im Anstellbottich (etwa 0,5 l dickbreiige Hefe auf 1 hl Würze), Hauptgärung im Gärkeller in offenen Bottichen (bei 5–9°, 10 bis 14 Tage), Nachgärung im Lagerkeller in Fässern oder Lagertanks bei etwa 1° (6–17 Wochen). Sodann werden die Fässer zugespundet (so daß der CO₂-Gehalt von 0,3–0,4% erhalten bleibt). Aus den Gärbottichen wird die mittlere Hefeschicht für weitere Gäransätze benutzt.

Herstellung obergäriger Biere sehr verschieden (z. B. Weißbiere, englische Biere, belgische Spezialbiere). Z. B. Weißbierbrauerei: Verwendung von $\frac{2}{3}$ Weizenmalz und $\frac{1}{3}$ Gerstenmalz. Die Würze wird nicht gekocht und daher auftretende Milchsäurebakterien spontan gesäuert. Gärdauer 3–5 Tage bei 16–19°. Je wärmer die Gärung, desto saurer das Bier. Die sich an der Oberfläche sammelnde Hefe wird samt den anhaftenden Milchsäurebakterien für die nächste Gärung entnommen. — Lagerung des vergorenen Weißbiers nach Mischung mit 15–25% Jungbier 2–3 Wochen.

Alkoholgehalt und Extraktgehalt einiger Biere (in %): Pschorr (München): 3,62 und 6,47; Märzenbier (Berlin): 4,07 und 5,49; Pilsner Urquell: 3,61 und 5,0; Berliner Weißbier: 3,07 und 3,19; Porter: 6,72 und 8,68 usw.

b) Weingewinnung². *Ausgangsstoffe*: In erster Linie Trauben (Traubenweine), ferner auch verschiedene Obst- und Beerenfrüchte u. a. Stoffe (z. B. Apfelwein, Johannisbeer- und Stachelbeerwein, ferner Palmweine aus den Säften von Zuckerpalmen, Saké aus Reis in Japan usw.).

Phasen der Weinbereitung: 1. *Gewinnung des Mostes* durch Maischen der Trauben (Zerkleinerung derselben); bei Weißwein Abpressen („Keltern“) und Entfernung der Weintrester, bei Rotwein nur Entfernung der Stiele. Zuckergehalt des Traubensaftes 10–30%. 2. *Vergärung*: Meist spontan beim Stehen des Mostes oder unter Benutzung besonderer Kulturweihenefen. Gärung meist als Obergärung bei 15–30° (am Rhein als Untergärung bei 10–12° im Keller). Hauptgärung in 3–14 Tagen beendet; Nachgärung („stille Gärung“) dauert mehrere Wochen, unter Klärung des Weins. 3. *Lagern und Reifen des Weins* nach dem Abziehen in große hölzerne Lagerfässer, Lagerung mit verschlossenem Spund in kühlen Kellern; Ausbildung von Geschmacks- und Geruchsstoffen.

¹ Je nachdem wieviel Grade Bllg. die Würze zeigt, spricht man dann von einem 10grädigen, 12grädigen Bier usw.

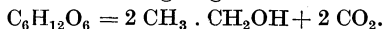
² Vgl. die Kapitel von VOGT sowie REINHARD im Hdb. d. Lebensmittelchemie, 7. Bd. Berlin: Julius Springer.

Alkoholgehalt: Reine Naturweine 7–10%, selten 12%; südländische Exportweine bis 20–24% (ein Alkoholgehalt von über 17% ist stets durch künstlichen Zusatz von Spirit bewerkstelligt). Gehalt an Extraktstoffen (Gesamtrockenrückstand) bei Naturweinen meist 1,8–2,5%. Wertvolles Nebenerzeugnis der Weingewinnung ist die Weinsäure, die sich insbesondere in Form ihres sauren Kaliumsalzes (Weinstein) beim Lagern des Weins in den Fässern absetzt.

c) **Gewinnung von Branntweinen**¹. Man geht hier stets von vergorenen Flüssigkeiten verschiedener Herkunft aus und unterwirft dieselben der Destillation. Weinbrennerei (besonders in Frankreich und Italien) zur Kognakerzeugung (älteste bekannte Art der Alkoholgewinnung). Obstbrennerei (insbesondere Zwetschen und Kirschen); Selbstgärung der Früchte oder Anwendung besonderer Weinhefen. Kornbrennerei, zur Erzeugung von Branntwein im üblichen Sinn (neben der Weinbrennerei die älteste Art der Alkoholherzeugung); Rohstoffe meist Roggen und Weizen. — Erzeugung von Whisky (aus Weizen, Mais u. a.), Arrak (aus Reis, aber auch aus dem Saft der Blütenkolben der Palmen), Rum aus den Rückständen der Zuckerrohrverarbeitung (Melasse, Abschaum, auch aus Rohzuckersirup).

Anhang III: Theoretisches.

Die normale Vergärung des Zuckers (erste Vergärungsform) verläuft nach der auch heute noch gültigen GAY-LUSSACschen Gleichung:



Theoretisch entstehen daher aus 1 Mol Hexose (180), 2 Mol Alkohol (92) und 2 Mol CO₂ (88), die theoretische Alkoholausbeute beträgt daher 51,1% der Hexose (oder 53,8% des Rohrzuckers). Der Abbau des Zuckers zu Alkohol und CO₂ geht dabei stufenweise vor sich, es wird eine große Anzahl von Zwischenprodukten durchlaufen, wobei miteinander gekuppelte oxydoreduktive Reaktionen stattfinden (vgl. Anhang zu Übung 14).

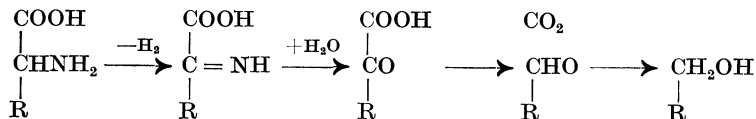
Vergärbare Zucker (Zymohexosen): d-Glucose, d-Fructose, d-Mannose, d-Galaktose; und zwar vergären Glucose und Fructose gleich schnell, während Mannose und besonders Galaktose langsamer vergoren werden. Die anderen Hexosen sowie die Pentosen sind unvergärbbar. Dioxyaceton wird vergoren, wobei allerdings intermediär Hexose (in phosphorylierter Form, vgl. S. 133/134) gebildet wird. Von Disacchariden werden vergoren: Rohrzucker, Trehalose, Maltose, Milchsucker, dabei scheint die Vergärung durch spezielle Hefen ohne Hydrolyse zu erfolgen (hinsichtlich des Verhaltens verschiedener Hefen zu Disacchariden vgl. S. 59).

Gärungshemmende Stoffe: Antiseptica wirken auf lebende Hefe hemmend, nicht aber auf die zellfreie alkoholische Gärung. Es ist jedoch möglich, durch Zusatz verschiedener Stoffe (Na-Fluorid, Jodessigsäure u. a.) einzelne Phasen der zellfreien Gärung zu hemmen.

Abbau der Aminosäuren durch Hefe. Derselbe geht neben der Äthanolgärung im normalen Eiweißstoffwechsel der Hefe vor sich und führt zur Bildung von Fuselölen und anderen Produkten; und

¹ Vgl. das Kapitel von BÜTTNER, im Hdb. d. Lebensmittelchemie, 7. Bd., Berlin: Julius Springer.

zwar nach EHRlich¹ in der Weise, daß zunächst aus den Aminosäuren die α -Ketosäuren gebildet und diese decarboxyliert werden; durch Reduktion der Aldehyde entstehen sodann die zugehörigen Alkohole:



So entsteht Isobutylcarbinol aus l-Leucin, sekundäres Butylcarbinol aus d-Isoleucin, Isobutylalkohol aus d-Valin usw. (z. B. auch Tyrosol aus Tyrosin² oder Tryptophol aus Tryptophan³), ferner auch Bernsteinsäure aus Glutaminsäure. Auch die Einwirkung von Hefe auf Arginin und Histidin wurde untersucht⁴. (Vgl. auch Nachtrag.)

C. Die Glyceringärungen und die Gewinnung sowie Umwandlung von Zwischenprodukten.

8. Übung:

Acetaldehyd-Glycerin-Gärung (zweite Vergärungsform).

a) Kleinversuch (Demonstrationsversuch)⁵, mit qualitativem Acetaldehydnachweis. 20 ccm einer 10%igen Rohrzuckerlösung (in einem kleinen Kölbchen oder weitem Reagensrohr) mit 2 g frisch gefälltem $\text{CaSO}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ versetzt, 2 g abgepreßte Hefe (Brauerei- oder Brennereihefe oder gärkräftige Bäckerhefe) in der Flüssigkeit gut aufgeschwemmt (kräftig durchgeschüttelt) und in ein Gärröhrchen eingefüllt, dessen kurzer, offener Schenkel durch eine Schlauchverbindung mit einem Glasrohr verlängert ist (Probe A). Zugleich Ansatz einer analogen Kontrollprobe, aber ohne Sulfit (B). Beide Gefäße werden in einem Wasserbad von 38—40° belassen. CO_2 -Entwicklung setzt bald ein. Nach 10 bis 15 Minuten (eventuell nach 30 Minuten) erfolgt der Nachweis des Acetaldehyds in Probe A (nach RIMINI): 3 ccm des Inhalts mittels einer Pipette entnommen, ohne zu filtrieren mit 0,5 ccm 4%iger Nitroprussidnatriumlösung und 2—3 ccm einer 3%igen Piperidinlösung versetzt: charakteristische tiefe Blaufärbung. Probe B gleich behandelt, Reaktion negativ.

¹ EHRlich: Biochem. Z. 2, 52 (1906).

² EHRlich: B. 44, 139 (1911). — Biochem. Z. 79, 232 (1917).

³ EHRlich: B. 45, 883 (1912).

⁴ S. EDLBACHER, M. BECKER und A. v. SEGESSER: H. 255, 53 (1938).

⁵ Vgl. KOBEL und NEUBERG in KLEIN: Hdb. d. Pflanzenanalyse, IV. Bd., 1263. Wien: Julius Springer 1933.

b) Gärversuch mit analytischer Bestimmung von Acetaldehyd und Glycerin. (Ansatz wie in Übung 7c): 10 g Rohrzucker, 0,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g Na_2HPO_4 , 0,025 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 0,025 g KCl in 50 ccm Wasser gelöst und in einem 200 ccm-Kölbchen mit 2 g gewaschener und abgepreßter Brennerhefe (obergärende Hefe) in üblicher Weise versetzt (in aufgeschlämmtem Zustand), mit Gäraufsatz verschlossen und bis zur gerade deutlich einsetzenden Gärung bei 30—35° stehen gelassen. Sodann Zusatz von 5 g Na_2SO_3 oder 10 g $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 50 ccm Wasser (frisch

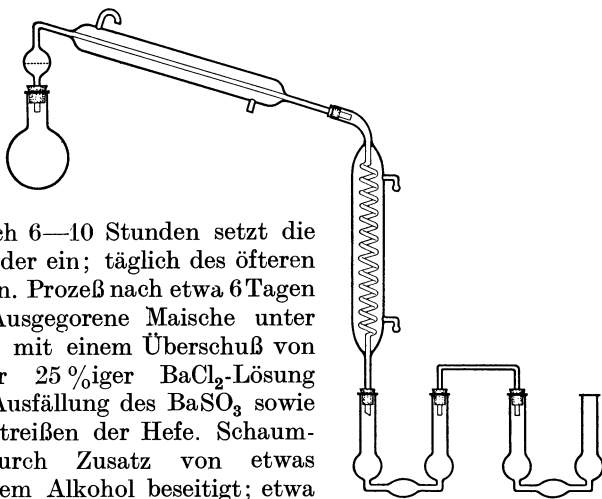


Abb. 26. Apparatur zur Bestimmung von Acetaldehyd.

gelöst). Nach 6—10 Stunden setzt die Gärung wieder ein; täglich des öfteren umschütteln. Prozeß nach etwa 6 Tagen beendet. Ausgegorene Maische unter Eiskühlung mit einem Überschuß von eisgekühlter 25 %iger BaCl_2 -Lösung versetzt; Ausfällung des BaSO_3 sowie BaCO_3 , Mitreißen der Hefe. Schaumbildung durch Zusatz von etwas aldehydfreiem Alkohol beseitigt; etwa $\frac{1}{2}$ Stunde in gut verschlossenem Gefäß im Eiskasten stehen gelassen. Filtration und Auswaschen im Eiskasten. Filtrat auf 250 ccm aufgefüllt (enthält neben Salzen und Glycerin das lösliche acetaldehydschweflige Barium).

Destillation und Bestimmung des Acetaldehyds. Ein aliquoter Teil des Filtrates (25 ccm, enthaltend etwa 100 mg Acetaldehyd) wird in den Destillierkolben (Abb. 26) eingefüllt, in dem sich 5 g CaCO_3 befinden. Die erste PELIGOT-Röhre ist mit 30—50 ccm $n/10$ Natriumbisulfitleösung gefüllt (hergestellt durch Lösen von Natriummetabisulfid in Wasser, gestellt gegen $n/10$ Jodlösung; Titer stets vor Benutzung der Lösung frisch ermitteln). Die zweite PELIGOT-Röhre enthält Wasser (um eventuell SO_2 aus der ersten aufzunehmen). Beide PELIGOT-Röhren befinden sich in einem mit Eis gefüllten Becken. Kolben-Inhalt auf einem BABO-Trichter

zum Sieden erhitzt. Innerhalb 30 Minuten ist der gesamte Acetaldehyd übergegangen. Inhalt beider PELIGOT-Röhren vereinigt und mit $n/10$ Jodlösung in üblicher Weise titriert. Man subtrahiert die verbrauchten $\text{ccm } n/10$ Jodlösung von den vorgelegten $\text{ccm } n/10$ Natriumbisulfatlösung und multipliziert mit 4,4032; dies ergibt mg Acetaldehyd in der destillierten Probe¹.

*Bestimmung des Glycerins*². Ein aliquoter Teil des Filtrates (25 ccm , enthaltend etwa 200 mg Glycerin) im FAUST-HEIMSchen Verdunstungskasten (oder mittels eines Föhns) auf etwa 10 ccm eingeeengt und mit einer Lösung von basischem Bleiacetat versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Nach einer Stunde wird zentrifugiert und ausgewaschen, Zentrifugat mit Schwefelwasserstoff entbleit und filtriert. Filtrat nun im Verdunstungskasten oder Vakuum zum Sirup verdampft, nochmals in wenig Wasser aufgenommen, filtriert und wieder verdampft. In Wasser aufgenommen, eventuell nochmals filtriert und auf 10 ccm aufgefüllt. Eine kleine Menge davon kann zum qualitativen Nachweis des Glycerins verwendet werden (vgl. S. 122, Note 2), weitere Proben (2—5 ccm) zur Glycerinbestimmung (nach dem Prinzip von ZEISEL-FANTO-STREITAR, Apparatur nach H. MEYER, unter Benutzung eines Heizmantels³), Vorlagen mit Pyridin gefüllt (wegen eventuell vorhandener, nicht entfernbarer Schwefelverbindungen). Probe im Kölbchen mit 15 ccm Jodwasserstoffsäure (d 1,91) versetzt, in üblicher Weise unter CO_2 -Durchleitung 2½ Stunden im schwachen Sieden erhalten. Drei Vorlagen mit je 20,20 und 10 ccm wasserfreiem Pyridin beschickt. Nach dem Abkühlen in CO_2 -Atmosphäre wird die Flüssigkeit aus den Vorlagen (enthaltend das Pyridin-isopropyljodid) mit Alkohol in einen 1½ l-ERLENMEYER-Kolben übergespült, mit 30—50 $\text{ccm } n/10$ Silbernitratlösung versetzt, sodann mit 750 ccm Wasser verdünnt und mit konzentrierter Salpetersäure angesäuert. Abscheidung von Silberjodid, 2—3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten Überschuß des Silbernitrates mit $n/10$ Ammonrhodanidlösung gegen Ferriammonsulfat als Indicator zurücktitriert. Differenz

¹ Falls auch Alkohol neben dem Acetaldehyd bestimmt werden soll, muß der letztere erst entfernt werden, und zwar entweder mittels HgO [vgl. GORR und WAGNER: *Biochem. Z.* **161**, 488 (1925)] oder mittels Dinitrophenylhydrazin; vgl. NEUBERG: *Biochem. Z.* **232**, 479 (1931). — Vgl. auch MEYERHOF und KIESSLING: *Biochem. Z.* **267**, 317 (1933).

² Vgl. KOBEL und TYCHOWSKY: *Biochem. Z.* **199**, 218 (1928).

³ Vgl. H. MEYER: *Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Substanzen*. Berlin: Julius Springer 1931.

ergibt die dem Glycerin entsprechende Menge. 1 ccm n/10 Silberlösung entspricht 9,2 mg Glycerin.

c) **Präparativer Gärversuch.** In einer 15 l fassenden Flasche werden 5 l einer 20%igen Zuckerlösung (1 kg Zucker)¹, mit 100 g frischer abgepreßter Brennereihefe in üblicher Weise versetzt und bei 30—35° schwach angären gelassen (Gärverschluß usw. wie in Übung 7e); sodann Zusatz von 1 kg $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ² in 5 l Wasser (allmählich unter gutem Umschütteln). Nach 6—10 Stunden setzt die Gärung wieder ein³ und ist nach 5 bis 6 Tagen beendet. Das Reduktionsvermögen gegenüber Ostscher Lösung⁴ soll nur noch sehr schwach oder negativ sein. Bei stärker positivem Ausfall der Reaktion wird noch Hefe zugesetzt und dann ausgären gelassen.

Destillation von Acetaldehyd und Alkohol. Die vergorene Flüssigkeit wird unter Eiskühlung mit einer konzentrierten Lösung von 900 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ versetzt; Fällung von Calciumcarbonat; dadurch wird einerseits das bei der Gärung erzeugte Natriumcarbonat und -bicarbonat entfernt (das den Aldehyd beim Erhitzen verharzen würde) und andererseits der Acetaldehyd freigesetzt; nach weiterem Zusatz von 200 g Kreide wird destilliert (wie in Übung 7e) und 2500 ccm aufgefangen. Durch fraktionierte Destillation des übergegangenen Anteils können Acetaldehyd und Alkohol angereichert werden.

Glycerindestillation. Der Rückstand nach der Aldehyd-Alkohol-Destillation wird filtriert und allmählich aus dem 3 l fassenden Kolben der Destillationsapparatur (Abb. 27) mit überhitztem Wasserdampf im Vakuum destilliert⁵. Die Apparatur ermöglicht auch gleich eine Konzentrierung des Glycerins in der Vorlage V₁. Handhabung: Das ganze System zwischen dem Schraubenquetschhahn H₂ und der Pumpe wird auf 10—12 mm evakuiert, dann das

¹ Der Zusatz von Nährsalzen ist nicht erforderlich, da Vermehrung der Hefe in dem alkalischen Milieu kaum stattfindet.

² Von technischem Salz ist entsprechend mehr zu nehmen.

³ Das vorübergehende Aussetzen der Gärung ist nicht nur auf die Schädigung der Hefezellen, sondern auch auf die Bindung von CO₂ als NaHCO₃ im alkalischen Milieu zurückzuführen.

⁴ Zusammensetzung derselben: 250 g wasserfreies Kaliumcarbonat und 100 g Kaliumbicarbonat in Wasser gelöst, langsam mit einer Lösung von 17,5 g Kupfersulfat versetzt und das Ganze auf 1 l aufgefüllt. Reduktion beim Erwärmen der Lösung mit der Probe. — Die Anwendung der FEHLINGSchen Lösung ist hier wegen Anwesenheit von Sulfit und Acetaldehyd zu vermeiden.

⁵ Vgl. NEUBERG und REINFURTH: Biochem. Z. **92**, 234 (1918). Siehe auch die von GRÜN beschriebene Apparatur (Analyse der Fette und Wachse 1. Bd., S. 531. Berlin: Julius Springer 1925).

Ölbad, in dem sich der Destillierkolben befindet, auf 200° erhitzt und durch Öffnen des Hahnes H_2 Wasserdampf eingeleitet¹, der Überhitzer (Ü) auf 220 — 230° angeheizt (Th_1) und die Ölbadtemperatur (Th_2) auf 240 — 250° gesteigert. Durch den Kühler K_1 wird warmes Wasser geleitet, durch den Kühler K_2 kaltes Wasser. Das Rohglycerin sammelt sich in der Vorlage V_1 an und wird hier gleichzeitig konzentriert, während wäßrige Anteile nach V_2 und V_3 übergehen. Durch den Capillarhahn H_3 wird von Zeit zu Zeit frische Lösung nachgefüllt. Der Zweiweghahn H_4 dient zur Probe-

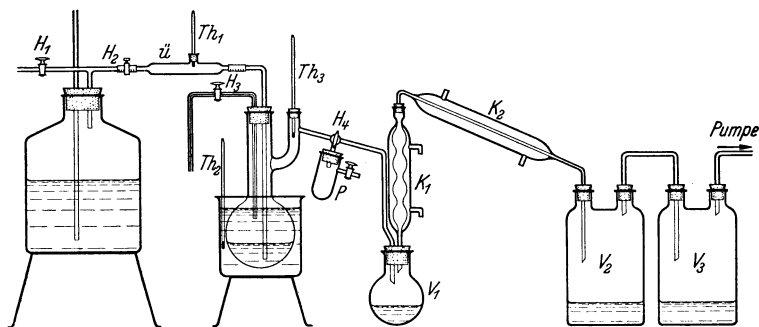


Abb. 27. Apparatur zur Glycerindestillation.

entnahme, und zwar zur Feststellung des Zeitpunktes, wann die Destillation beendet ist; man schaltet den Hahn so, daß die Verbindung mit dem gleichfalls evakuierten und mit der Pumpe verbundenen Proberohr P hergestellt und zugleich die Verbindung mit der übrigen Apparatur gesperrt wird, fängt nun etwas Destillat in P auf und prüft dieses auf Glycerin². Bilanz: Aus 1 kg Zucker erhält man etwa 200—250 g Glycerin, 200—300 g Alkohol und 50—100 g Acetaldehyd.

¹ Zur Regulierung des Dampfdruckes dient der Hahn H_1 unter Beobachtung des Wasserstandes im Steigrohr.

² Z. B. nach der Probe von MANDEL und NEUBERG [Biochem. Z. 71, 214 (1915)]. Einige Tropfen des Destillates werden verdünnt; 2—3 ccm der 0,1—1%igen Lösung versetzt man mit genau 3 Tropfen n-NaOCl und kocht 1 Min. Dieser Vorgang wird nochmals wiederholt, dann 3 Tropfen konz. Salzsäure hinzugefügt und $\frac{1}{2}$ —1 Min. gekocht (Austreiben von Chlor). Die völlig farblose Lösung versetzt man mit dem gleichen Volumen konz. Salzsäure und einer kleinen Messerspitze Orcin. Beim Kochen färbt sich die Mischung violett bis grünblau. Reiner Amylalkohol färbt sich beim Ausschütteln blaugrün.

Anhang I: Technologie der Glycerin-gärung.

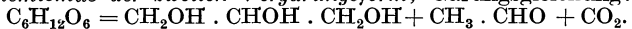
Die Erzeugung von Glycerin auf dem Gärungswege bildete in den Jahren 1916—1918 die Grundlage der Nitroglycerinerzeugung der Mittelmächte (in Friedenszeiten ist das Verfahren nicht rentabel, da ausreichende Glycerinmengen zur Verfügung stehen¹). Durchführung in Melassebrennereien, deren Apparatur direkt benutzt werden kann. Die Gärung wurde in Gärbottichen von über 1000 cbm Inhalt mit gutem Erfolg vorgenommen; Gärdauer bis 90 Stunden; Temperatur 30—35°. Die normale vergorene Maische enthielt 3% Glycerin, 2% Alkohol und 1% Acetaldehyd, gebunden an Sulfit. Die technische Ausbeute an fertigem Glycerin, bezogen auf Zucker, betrug 20—25%. Die abfallende Hefe kann nach einer Regenerierungsgärung bei schwach saurer Reaktion wiederholt benutzt werden. Nach späteren Verfahren² wird eine höherprozentige Glycerinlösung dadurch erhalten, daß die flüchtigen Gärprodukte aus der Maische abdestilliert werden und diese unter neuerlichem Hefe- und Zuckerzusatz vergoren wird. Ferner soll man mit einem geringeren Salzzusatz auskommen³, wenn man ein Gemisch von Sulfit und Bisulfit verwendet, das ungefähr lackmusneutral gehalten wird. Die Ausbeute an Glycerin soll dadurch erheblich gesteigert werden, und zwar auf 42 Teile Glycerin 21,8 Teile Acetaldehyd und 4,5 Teile Alkohol aus 100 Teilen Zucker.

Neuerdings wurde auch die Glycerin-gewinnung aus synthetischem Zucker (aus Formaldehyd hergestellt) beschrieben⁴. Ferner wurde auch kräftige Belüftung der Gärflüssigkeit empfohlen, wobei wilde Hefen verwendet werden können⁵.

Als Nebenprodukte der gärungstechnischen Glycerinerzeugung treten 1,3-Propan-diol (Trimethylenglykol)⁶ und 1,2-Propan-diol (Propylenglykol)⁷ auf. Diese entstehen wohl erst durch eine nach der Glycerinbildung einsetzende Nebengärung (Reduktion von Glycerin). WERKMAN und GILLEN⁸ konnten auch Bakterien isolieren, die zur Bildung von Trimethylenglykol aus Glycerin befähigt sind.

Anhang II: Theoretisches.

Chemismus der zweiten Vergärungsform; Gärungsgleichung:



Der Acetaldehyd wird dabei durch das Natriumsulfit gebunden, das als Abfangmittel wirkt. Neben der spezifischen abfangenden Wirkung des Sulfits ist aber auch noch eine allgemeine Salzwirkung zu berücksichtigen, indem auch in Gegenwart größerer Mengen anderer

¹ Ausarbeitung des Verfahrens von CONNSTEIN und LÜDECKE [vgl. B. 52, 1386 (1919); Seifenfabrikant 1919, 310] unabhängig von NEUBERG und FÄRBER [Biochem. Z. 78, 264 (1916)]. — Vgl. ferner DRP. 298 593-6 der Vereinigten Chem. Werke Charlottenburg.

² K. und N. LÜDECKE: E. P. 278 086 (1926).

³ COCKING und LILLY, England: DRP. 472 870.

⁴ K. LÜDECKE: DRP. 658 047 (1938). — C. 1938, II 438.

⁵ HAEHN: E. P. 488 464; F. P. 829 263. — C. 1933, II 2857.

⁶ RAYNER: C. 1926, II 2509.

⁷ SCHUTT: Oe. Chem. Ztg. 30, 170 (1927).

⁸ WERKMAN und GILLEN: J. Bact. 23, 167 (1932).

Salze die Glycerinbildung wesentlich gefördert wird; z. B. in Gegenwart großer Mengen (über 20%) Calciumchlorid, Natriumchlorid, Natriumsulfat, Ferrosulfat, Aluminiumsulfat und andere (Erhöhung der Glycerinausbeute vielfach auf über 10% des Zuckers¹).

Sonstige Verfahren zur Acetaldehydabfangung:

a) Dimedon (Dimethon = Dimethylhydroresorcin, Dimethylcyclohexandion); Zusatz zum Gäransatz. Abscheidung des wasserunlöslichen Kondensationsproduktes Aldomedon (Aldomethon), bestehend aus 1 Mol Acetaldehyd und 2 Mol Dimethon. Isolierung und Identifizierung des Kondensationsproduktes (Schmelzpunkt 139–140°, Überführung in das Anhydrid vom Schmelzpunkt 173–175°)².

b) Säurehydrazide als Abfangmittel: Mittels Semicarbazid sowie Thiosemicarbazid können bis 15% Acetaldehyd und die äquivalente Menge Glycerin erhalten werden³, weniger geeignet sind Benzhydrazid und Phenyllessigsäurehydrazid⁴.

9. Übung:

Decarboxylierung der Brenztraubensäure.

a) **Kleinversuch mit frischer Hefe** (Demonstrationsversuch⁵ mit qualitativem Acetaldehydnachweis). 20 ccm einer 1%igen Brenztraubensäurelösung mit 3 g abgepreßter Hefe⁶ (wie in Übung 8a) versetzt, in ein Gärröhrchen eingefüllt und genau so weiter behandelt wie in Übung 8a. Ebenso eine Kontrollprobe mit der Hefe und Leitungswasser allein. Schon nach wenigen Minuten ist in der Hauptprobe Gärung feststellbar, nach 20—25 Minuten ist das Gärröhrchen schon ziemlich mit CO₂ gefüllt. Probe auf CO₂: Einführung von konzentrierter Kalilauge mittels einer hakenförmig gebogenen Pipette in den langen Schenkel des Gärröhrchens; Absorption des Gases bis auf ein kleines (der Hefe entstammendes) Luftbläschen. Nachweis des Acetaldehyds in einer Probe in üblicher Weise (vgl. S. 118).

b) **Demonstrationsversuch mit Trockenhefe**⁷. 14 ccm n/10 Brenztraubensäurelösung (100 ccm enthalten 0,88 g = 0,7 ccm frisch destillierter Brenztraubensäure) und 1,5 ccm 2 m-Kaliumacetatlösung (19,6 g K-Acetat in 100 ccm) langsam unter Schütteln

¹ Vgl. CONNSTEIN und LÜDECKE: B. 52, 1386 (1919).

² NEUBERG und REINFURTH: Biochem. Z. 106, 281 (1920).

³ NEUBERG und KOBEL: Biochem. Z. 188, 211 (1927). — KOBEL und TYCHOWSKY: Biochem. Z. 199, 218 (1928).

⁴ KLEIN und FUCHS: Biochem. Z. 213, 40 (1929).

⁵ NEUBERG und KARZAG: Biochem. Z. 36, 76 (1911).

⁶ Die carboxylatischen Fähigkeiten der Hefen sind recht verschieden. Falls gerade eine Hefe nicht befriedigt, müssen andere erprobt werden.

⁷ NEUBERG: Biochem. Z. 152, 203 (1924).

mit 2 g Trockenhefe oder Acetonhefe versetzt. Hefe gut verteilen, Gemisch in ein Gärröhrchen einfüllen. Im übrigen wie zuvor weiter behandeln. Sofortiger Gärungsbeginn, in wenigen Minuten ist der lange Schenkel des Gärröhrchens mit CO_2 gefüllt. Nachweis der Reaktionsprodukte wie zuvor.

e) **Brenztraubensäurespaltung in Gegenwart von Natriumsulfit**¹. 2 ccm m-Brenztraubensäurelösung, 2 ccm m-Natriumsulfitlösung, 2 ccm Essigsäure-Acetatpuffer (6 g Eisessig und 27,2 g kristallisiertes Na-Acetat in 100 ccm) und 14 ccm Wasser mit 2 g untergäriger oder obergäriger Trockenhefe (oder 3 g frischer Hefe) versetzt, gut verteilt, ins Gärröhrchen gebracht und wie zuvor weiter behandelt. Stürmische CO_2 -Entwicklung. Nachweis der Reaktionsprodukte wie zuvor.

d) **Gärversuch mit quantitativer Bestimmung der Reaktionsprodukte** (Versuchsordnung wie in Übung 7c) in Gegenwart von Natriumsulfit. Gäransatz 200 ccm (zehnfach größer als in Versuch c). Ablesung der gebildeten CO_2 -Menge wie in Übung 7c. Bestimmung des Acetaldehyds nach Zerlegung des Sulfitkomplexes und Destillation über CaCO_3 vgl. Übung 8b.

Anhang: Theoretisches.

a) **Allgemeines.** Die Brenztraubensäurespaltung wird durch die Carboxylase bewirkt, ein Teilferment der Zymase, und zwar durch lebende Organismen, Trockenpräparate sowie Fermentlösungen (z. B. dialysierter Hefesaft², Macerationssäfte obergäriger Hefen³, auch durch gelagerte Säfte⁴). Die Carboxylase ist gegenüber verschiedenen Einflüssen sowie Zusätzen recht unempfindlich; z. B. lebende Hefen in Gegenwart von Toluol, Chloroform, Phenol, Sublimat und anderen Zellgiften, durch die wohl die Zuckervergärung, nicht aber die Carboxylasetätigkeit gehemmt wird.

b) **Decarboxylierung anderer α -Ketosauren.** Z. B. α -Ketobuttersäure, α -Keto-isovaleriansäure, α -Keto-n-capronsäure, α -Keto-glutar-säure, Oxalessigsäure (dabei auch β -Decarboxylierung) u. v. a. Nicht decarboxyliert wird z. B. Trimethylbrenztraubensäure. Reine carboxylatische Spaltung der verschiedenen Ketosauren stets in Gegenwart von sekundärem Sulfit, indem der abgefangene Aldehyd vor der weiteren biochemischen Umsetzung geschützt wird (z. B. vor der Reduktion oder Acyloinkondensation).

c) **Chemie und Wirkungsweise der Carboxylase.** Dieselbe kann durch Behandeln mit schwach alkalischem Phosphat (bei etwa pH 8,0) in das Fermentprotein (Apoferment) und die aktive Gruppe (Co-

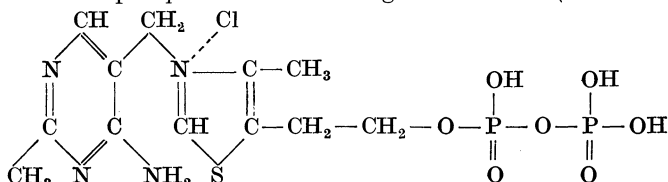
¹ NEUBERG und REINFURTH: B. 53, 1046 (1920).

² NEUBERG: Biochem. Z. 71, 1 (1915).

³ NEUBERG und CZAPSKI: Biochem. Z. 67, 9 (1914).

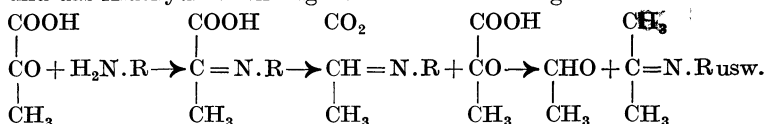
⁴ AUHAGEN: H. 204, 149 (1932).

Carboxylase) zerlegt werden¹. Siehe ferner Nachtrag. Die Co-Carboxylase ist die Diphosphorsäureverbindung des Aneurins (Vitamin B₁)²:



1 kg frischer Hefe enthält ungefähr 90 mg Co-Carboxylase.

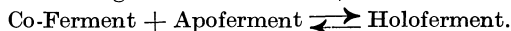
Als Reaktionsmechanismus der Carboxylase wird in Anlehnung an die Carboxylase-Modelle³ angenommen, daß die Reaktion unter Mitwirkung der Aminogruppe der Co-Carboxylase über die Iminosäure und das Aldehydimin in folgender Weise vor sich geht:



Chemie der Enzyme im allgemeinen.

Zu einem Enzymsystem gehören folgende Bestandteile sowie Hilfsstoffe⁴:

a) **Das Holoferment** (das vollständige Fermentmolekül) entsteht durch Vereinigung des Co-Fermentes (einer niedrigmolekularen Komponente, Wirkgruppe) mit dem Apoferment (einem spezifischen, hochmolekularen Träger von Eiweißnatur)⁵:



Das Co-Ferment ist jeweils für die Wirkungsspezifität, das Apoferment für die Substratspezifität verantwortlich. Das gleiche Co-Ferment kann daher — je nachdem an welches Apoferment es gebunden ist. — auf verschiedene Substrate, aber stets grundsätzlich gleich, einwirken. Holofermente mit schwer oder nicht abdissoziierbaren Co-Fermenten haben daher einen nur sehr engen Wirkungsbereich.

b) **Aktivatoren, Hemmungskörper, Komplemente, Kinasen.** Dieselben sollen keine unmittelbaren Bestandteile des Enzymsystems sein. Hinsichtlich der näheren Definition und Unterscheidung besteht noch keine Klarheit. Ihre Wirkung kann sich auf folgende Fälle beziehen: Angriff auf das Substrat (vgl. Glutathion, S. 172), auf die

¹ AUHAGEN: H. 204, 149 (1932).

² LOHMANN: Angew. Chem. 50, 221 (1937). — Bioch. Z. 294, 188 (1937).

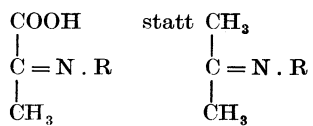
³ LANGENBECK: Erg. d. Enzymf. 2, 320 (1933).

⁴ Vgl. die Zusammenfassung von ALBERS: Angew. Chem. 49, 448 (1936). — AMMON und DIRSCHERL: Fermente, Hormone, Vitamine. Leipzig 1938.

⁵ Bereits MATHEWS und GLENN [J. biol. Chem. 9, 51 (1914)] haben die Ansicht entwickelt, daß die Enzyme aus einem kolloidalen Träger und einer aktiven Gruppe bestehen.

Berichtigung.

Auf Seite 126, 2. Formel muß es heißen:



Ferment-Substrat-Verbindung oder auf einen Bestandteil des Fermentes selbst; z. B. durch Bindung von Stoffen an das Apoferment kann eine Erweiterung des Spezifitätsbereiches bewirkt werden. Oder Adsorption gewisser Stoffe am Ferment und „Blockierung“ desselben; oder aktivierende Wirkung verschiedener Stoffe durch Beseitigung von Hemmungskörpern. — Ferner hängt die Aktivität mancher Fermentsysteme in hohem Maße von den anwesenden Ionen ab, die wohl für die Stabilität empfindlicher Fermentproteine von wesentlicher Bedeutung sind; dabei können manche Ionen stabilisierend, andere schädigend wirken.

Beziehungen der Enzyme zu den Vitaminen und Hormonen. Manche Co-Fermente wirken nach geringfügigen chemischen Umwandlungen als Vitamine oder Hormone. Z. B. Vitamin B₁ = Aneurin, Aneurin-Pyrophosphat = Co-Carboxylase, Vitamin B₂ = Lactoflavin, Lactoflavin-Phosphorsäure = Co-Ferment des gelben Oxydationsfermentes, Vitamin C (Ascorbinsäure) = Co-Ferment tierischer Lipase usw.

10. Übung:

Alkalische Gärung (dritte Vergärungsform).

Gärversuch mit analytischer Bestimmung der Gärprodukte. 10 g Rohrzucker, 18 g K₂HPO₄ (einer etwa molaren Lösung entsprechend) oder 13 g NaHCO₃ (einer etwa 1½-molaren Lösung entsprechend) in 100 ccm Wasser gelöst und mit 10 g abgepreßter Brennereihefe in üblicher Weise versetzt. Die Gärung ist nach etwa drei Tagen bei 30—35° beendet. Reduktion von FEHLINGScher Lösung¹ nur noch sehr schwach. Aufarbeitung: Abfiltrieren der Hefe, Auswaschen, Auffüllen auf 150 ccm. Verwendung aliquoter Teile für die Bestimmungen (Essigsäure und Glycerin). Acetaldehyd ist bei vollendeter Gärung meist nur in geringer Menge vorhanden (qualitative Prüfung einer Probe), Äthanol ist reichlich vorhanden (und zwar entsteht nicht nur der der Essigsäure äquivalente Anteil, sondern eine weitere Menge bildet sich auch gemäß der ersten Vergärungsform).

Essigsäure. 25 ccm Filtrat werden durch Zusatz von 2 n-Schwefelsäure kongosauer gemacht, unter Rückflußkühlung 5 Minuten gekocht (Entfernung von CO₂) und sodann mit Wasserdampf destilliert, solange noch saure Reaktion nachweisbar ist. Titration des Destillates mittels n/10 Lauge². 1 ccm entspricht 6 mg Essigsäure = 9 mg Glucoseäquivalente.

Glycerin. 25 ccm des Filtrates (enthaltend etwa 200 mg Glycerin) genau so behandelt wie in Übung 8b.

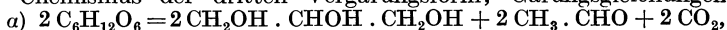
¹ Vgl. S. 160.

² Bei genauen Bilanzversuchen muß noch ein paralleler Gärversuch ohne Zusatz von Alkali vorgenommen und in gleicher Weise die entstandene Säure bestimmt werden; der gefundene Wert ist dann von dem im Hauptversuch ermittelten abzuziehen.

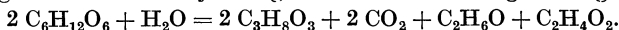
Ausbeuteberechnung: Es werden insgesamt z. B. 1,2 g Glycerin gefunden (entsprechend 1,17 g-Äquivalenten Glucose) sowie die äquivalente Menge Essigsäure (gemäß der Gärungsgleichung; vgl. unten), so daß insgesamt etwa 2,4 g Glucose (bzw. Rohrzucker) gemäß der dritten Vergärungsform abgebaut wurden, der Rest nach der ersten Vergärungsform.

Anhang: Theoretisches.

Chemismus der dritten Vergärungsform; Gärungsgleichungen:



Die Zuckerspaltung findet demnach zunächst nach der zweiten Vergärungsform statt, doch wird der Acetaldehyd nicht angehäuft, sondern er unterliegt einer Dismutation unter Bildung von Äthanol und Essigsäure. Im Anfangsstadium der Gärung lassen sich auch stets größere Acetaldehydmengen nachweisen. Endgleichung:



Zur Verwirklichung der dritten Vergärungsform muß der pH -Wert der Lösung größer als acht sein. Neben derselben findet stets auch normale Zuckervergärung statt; und zwar erfolgt Umsetzung nach der dritten Vergärungsform maximal bis zu 35,4%, der Rest nach der ersten Vergärungsform. Die Tätigkeit der Invertase wird im alkalischen Milieu nicht gestört. Die Umwandlung des Acetaldehyds erfolgt unter der Wirkung der Aldehydmutase.

11. Übung:

Darstellung der Hexosephosphate.

a) Darstellung des Hexosediphosphats¹. Gewinnung des Ca-Salzes, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4(\text{PO}_4\text{Ca})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. 400 g Rohrzucker und 83 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in einer 8 l-Flasche in 2 l Wasser von 46° gelöst, mit 22 g NaHCO_3 versetzt (pH -Optimum zwischen 6,2 und 6,6), 600 g Unterhefe gut suspendiert, 100 ccm Toluol zugesetzt, unter häufigem Umschwenken bei 37° aufbewahrt. CO_2 -Entwicklung und Veresterung beginnen bald. Entnahme von Proben und Prüfung auf anorganisches Phosphat: je 2 ccm entnommen, 4 ccm 2½%ige Ammoniaklösung zugefügt, durch ein trockenes Filter gegossen, 2 ccm des klaren Filtrates mit 3 ccm Magnesiamixtur versetzt. Nach 5—7 Stunden (bei manchen Hefen auch früher) ist der Prozeß beendet. Der Zeitpunkt der vollständigen Veresterung darf nicht überschritten werden, da später wieder Zerlegung stattfindet.

Aufarbeitung: Reaktionsgemisch mit 2 n-Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert und etwa 20 Minuten im siedenden

¹ Vgl. NEUBERG und KOBEL, in OFFENHEIMER und PINCUSSEN, Methodik der Fermente, Thieme, Leipzig, S. 406, 1929.

Wasserbad erhitzt; dann zentrifugiert oder filtriert. Das Filtrat enthält hauptsächlich hexosediphosphorsaures Natrium, neben geringen Mengen des Monophosphats. — Filtrat in einem Rundkolben im Wasserbad auf etwa 95° erwärmt und mit einer siedenden Lösung von 108 g krystallisiertem Calciumchlorid in 100 ccm Wasser gefällt. Möglichst heiß durch eine angewärmte Nutsche abgesaugt, mit wenig siedendem Wasser nachgewaschen. Umfällung: der feuchte Niederschlag in etwa 500 ccm 2 n-Essigsäure unter Zusatz von etwa 250 ccm Wasser gelöst, klar filtriert und Filtrat mit 2 n-Natronlauge gegen Lackmus genau neutralisiert. 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, möglichst heiß abgesaugt und mit wenig siedendem Wasser nachgewaschen. Nach dem Trocknen erhält man ein technisch reines Produkt (analog dem Candiolin des Handels).

Reinigung¹: 10 g Candiolin in 64 ccm 2 n-Salzsäure unter Zusatz von 50 ccm Wasser in der Kälte gelöst. Ohne zu filtrieren unter Eiskühlung 65—66 ccm 2 n-NaOH tropfenweise zugefügt. Ausfällung anorganischer Phosphate neben kleinen Mengen Ca-hexosediphosphat. Rasch absaugen, mit Salzsäure gegen Lackmus genau neutralisieren. Die klare Lösung wird auf dem Wasserbad bis auf 90° erhitzt: Abscheidung des Ca-Salzes (in Form mikroskopischer Kügelchen). Reinheitsprüfung: Die eisgekühlte Lösung in verdünnter Säure (vgl. oben), nach Verdünnung und Neutralisation mit Ammoniak darf mit Magnesiamixtur keine Fällung geben. Andernfalls muß die Prozedur nochmals wiederholt werden.

Herstellung der löslichen Modifikation des Ca-Salzes¹: Das reine Ca-Salz in möglichst wenig verdünnter Milchsäure gelöst, mit Ammoniak unter Eiskühlung gegen Lackmus deutlich alkalisch gemacht, klar filtriert und mit Alkohol gefällt; amorphe, voluminöse Masse, auf der Nutsche gewaschen (Ammoniak und Ammonlactat entfernt), schließlich mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. Produkt löst sich glatt in Eiswasser, beim Erhitzen scheidet sich wieder die schwer lösliche Modifikation ab. Herstellung des Mg-Salzes und der Alkalisalze aus dem Ca-Salz durch Umsetzung (z. B. mit Na- oder K-Carbonat).

b) Darstellung des Hexosemonophosphats² (Gleichgewichtsester). In einem mit Rührwerk, Wasserverschluß³ und Tropf-

¹ Vgl. NEUBERG und KOBEL, in OPPENHEIMER und PINCUSSEN, Methodik der Fermente, Thieme, Leipzig, S. 406, 1929.

² ROBISON und MORGAN: Bioch. J. **22**, 2277 (1928); **24**, 119 (1930). — WARBURG und CHRISTIAN: Bioch. Z. **254**, 567 (1932).

³ Der Wasserverschluß ermöglicht eine annähernde Verfolgung des Verlaufes der Gärung, die dauernd kräftig in Gang bleiben soll.

trichter versehenen 10 l fassenden Gärgefäß (vgl. Abb. 9) werden unter dauerndem Rühren bei 29° 1200 ccm frischer Macerations-saft (vgl. Übung 6e) und 120 g Glucose in Abständen von 6 Minuten mit je 100 ccm einer Glucose-Phosphatlösung (300 g Glucose, 300 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 20 g KH_2PO_4 mit Wasser auf 1500 ccm gebracht) solange versetzt, bis in 90 Minuten 1500 ccm zugefügt sind; dann läßt man noch 15 Minuten stehen. Während der ganzen Zeit soll die Gärung kräftig in Gang bleiben.

Aufarbeitung. Enteiweißung: Man versetzt sofort mit 80 g Trichloressigsäure (gelöst in 100 ccm Wasser) und läßt nach Zusatz einiger Tropfen Oktylalkohol etwa 12 Stunden bei 0° stehen. Nach dem Abzentrifugieren wird die überstehende Lösung noch durch ein Filter gesaugt.

Abscheidung der anorganischen Phosphate und des Hexosediphosphats als Ba-Salze. Das Filtrat versetzt man mit 320 g festem Ba-Acetat, neutralisiert mit heiß gesättigter Barytlösung (Phenolphthalein), fügt $\frac{1}{4}$ des Volumens an Alkohol hinzu, schüttelt um und saugt ab.

Abscheidung des Monophosphates als Bleisalz im Filtrat durch Zusatz von 0,8—2,7 kg Bleiessig (Liquor Plumbi subaceticus DAB 6) je nach dem Gehalt an Monoester. Ein zu großer Überschuß ist dabei zu vermeiden, da sonst Wieder-auflösung eintritt.

Überführung des Bleisalzes in das Bariumsalz. Das abzentrifugierte und mit Wasser gewaschene Bleisalz (die Menge des Waschwassers soll etwa dem halben Volumen der Mutterlauge entsprechen) wird mit Wasser in einer Reibschale verrieben und auf der Schüttelmaschine etwa 12 Stunden unter Einleiten von Schwefelwasserstoff geschüttelt. Das Filtrat wird im Vakuum vom Schwefelwasserstoff befreit, mit Baryt (wie oben) neutralisiert (40—130 g) und nach der Filtration durch ein Faltenfilter in das doppelte Volumen Alkohol gegossen. Das Ba-Salz wird dann abgesaugt, mit absolutem Alkohol in einer Reibschale verrieben, wieder abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute 100—300 g am Rohprodukt, je nach der Güte des Macerationssaftes und der Eignung der verwendeten Hefe.

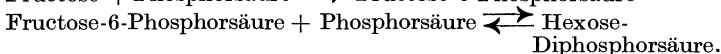
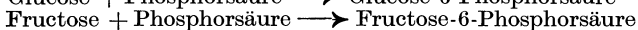
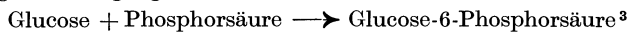
Umwandlung des Ba-Salzes in das Ca-Salz: 100 g rohes Ba-Salz in 500 ccm Wasser gelöst und zur Abscheidung von Verunreinigungen bei schwach alkalischer Reaktion mit einer 15%igen Lösung von Mercuriacetat versetzt, bis nichts mehr ausfällt (etwa 75 ccm). Filtrat mit H_2S , von Quecksilber befreit,

filtriert und 12 Stunden durchlüftet. Dreimaliges Schütteln mit je 3 g Tierkohle und jedesmalige Filtration. Farblose Lösung mit einem kleinen Überschuß an Schwefelsäure versetzt, Bariumsulfat abzentrifugiert. Lösung mit etwas mehr als der berechneten Menge Ca-Acetat versetzt (35 g in 170 ccm warmem Wasser), wobei kein Niederschlag entstehen darf. Zusatz von Alkohol (etwa 200 ccm) unter kräftigem Schütteln, bis der an der Eingußstelle entstehende Niederschlag gerade noch gelöst wird. Beim Erwärmen der Lösung auf dem siedenden Wasserbad fällt das Ca-Salz der Hexosemonophosphorsäure als schwerer, sich rasch absetzender Niederschlag aus, der heiß abgesaugt wird. Man wäscht auf der Nutsche zuerst mit heißem 30%igen Alkohol, dann mit kaltem absolutem Alkohol. Die Mutterlauge dieser Fraktion wird mit Eiswasser gekühlt, wieder mit Alkohol in analoger Weise wie zuvor versetzt (etwa 300 ccm) und wie oben weiter behandelt. Ausbeute an beiden Fraktionen etwa 32 g. Die weiteren in analoger Weise erhältlichen Anteile sind schon weniger rein.

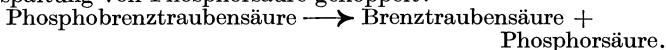
Das Ca-Salz besteht vornehmlich aus Glucosemonophosphat, daneben Fructosemonophosphat. Nach SMYTHE¹ enthält es aber auch ein kristallisiertes Doppelsalz von Hexosemonophosphorsäure und α -Glycerinphosphorsäure. Die Ausbeute an Hexosemonophosphat kann nach dem gleichen Autor² erhöht werden, wenn man die Gärung und Phosphorylierung in Gegenwart gewisser Farbstoffe durchführt. Dabei entsteht ein Gemisch von Glucose-, Fructose- und Mannose-6-Phosphorsäure.

Anhang: Theoretisches.

a) Das Fermentsystem der Phosphorylierungsreaktionen katalysiert folgende Vorgänge:



Diese Reaktionen sind mit folgender noch später zu besprechenden Abspaltung von Phosphorsäure gekoppelt:



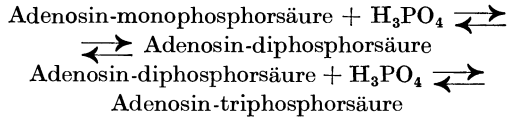
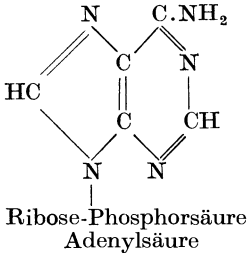
Weiterhin katalysiert die Phosphorylase im Muskelstoffwechsel die Phosphorylierung von Kreatin und Arginin.

¹ SMYTHE: J. biol. Chem. **117**, 135 (1935).

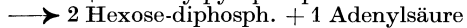
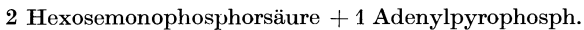
² SMYTHE: ebenda **118**, 619 (1937).

³ Die umgekehrte Reaktion, also die Verseifung, wird durch ein anderes Ferment (die Phosphatase) katalysiert. Vgl. dazu SCHÄFFNER, BAUER und BERL: H. **232**, 213 (1935).

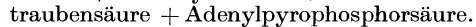
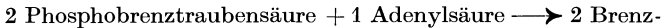
Die *Wirkungsgruppe des Phosphorylasesystems* ist sehr leicht abdissoziierbar. Als Co-Phosphorylase fungiert dabei das Adenylsäuresystem (in der lebenden Hefe in Form eines Dinucleotids vorhanden) das Phosphorsäure aufzunehmen oder abzugeben vermag:



Auf diese Weise können mit Hilfe des Adenylsäuresystems Umphosphorylierungen zustande kommen, z. B. folgende gekoppelten Reaktionen:



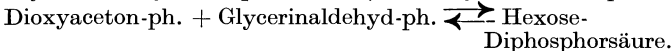
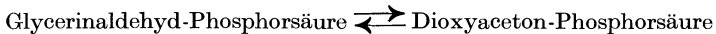
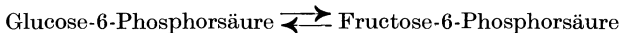
und andererseits:



Das Co-Ferment muß nun an einer Eiweißkomponente verankert sein, um wirken zu können. Während es selbst nur wirkungsspezifisch eingestellt ist, hängt die Substratspezifität von der Art des kolloidalen Trägers ab, an dem es gerade verankert ist; davon hängt es also ab, welche spezielle Reaktion gerade katalysiert wird.

Weiterhin ist für die Phosphatübertragungen die Anwesenheit von Mg-Ion erforderlich, das jedoch durch das noch stärker wirkende Mangan ersetzt werden kann¹.

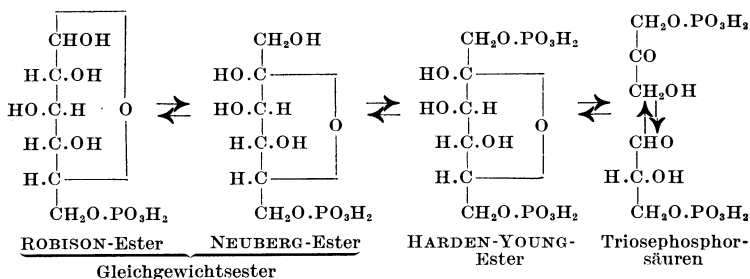
b) Das Zymohexase-System. Dasselbe besteht nach MEYERHOF² aus den Isomerasen (Phosphohexomutase und Phospho-trio-mutase) und der Aldolase. Eine Trennung der einzelnen Fermente dieses Systems ist bisher noch nicht gelungen. Es werden durch dasselbe folgende reversible Isomerisierungs- und Aldolisierungsreaktionen katalysiert:



Der durch diese Reaktionen charakterisierte Abschnitt der alkoholischen Gärung im Macerationssaft läßt sich durch folgende Formelbilder wiedergeben:

¹ OHLMEYER und OCHOA: Bioch. Z. **293**, 338 (1937).

² Vgl. dazu die Zusammenfassung von MEYERHOF: Erg. d. Physiol., biol. Chemie u. exper. Pharmakologie Bd. **39**, S. 10. München: J. F. Bergmann 1937.



Der zunächst entstehende Gleichgewichtsester¹ enthält etwa 75% ROBISON-Ester (= Glucose-6-Phosphorsäure) und 25% NEUBERG-Ester (= Fructose-6-Phosphorsäure). Die Gleichgewichtsform wird unter der Einwirkung der Phosphohexomutase von beiden reinen Körpern aus in wenigen Sekunden erreicht; ebenso bei der unsymmetrischen Spaltung des Hexosediphosphats. Bei der Vergärung von Glucose oder Fructose durch Macerationsssaft wurde auch Mannose-6-Phosphorsäure gewonnen, viel reichlicher allerdings durch Vergärung von Mannose selbst. Die Beteiligung derselben am oben genannten Gleichgewicht ist noch nicht geklärt.

Mit Ausnahme der Glycerinaldehyd-Phosphorsäure (vgl. Nachtrag) konnten alle Produkte des obigen Schemas isoliert werden. Dieselbe geht aber auch beim Zusatz zum Enzymextrakt sofort in Dioxyacetonphosphorsäure über, und zwar rascher als sich das Gleichgewicht Hexosediphosphorsäure \rightleftharpoons Triosephosphorsäure einstellt². Außerdem scheint die isolierte Dioxyaceton-Phosphorsäure etwa 5% d-Glycerinaldehydphosphorsäure zu enthalten (Drehung und Jodverbrauch). Von Wichtigkeit ist weiterhin, daß die gesamte Reaktion durch Jodessigsäure gehemmt wird.

Das oben dargestellte Gleichgewicht stellt sich sehr rasch ein (etwa in $\frac{1}{2}$ Minute ist es schon fast vollständig erreicht); Lage desselben abhängig von der Temperatur, und zwar bei höherer Temperatur zugunsten der Triosephosphorsäure verschoben, bei tieferer Temperatur zugunsten der Hexosediphosphorsäure (das Verhältnis Triosephosphorsäure:Hexosediphosphorsäure ist bei 60° etwa 70:30, bei 20° etwa 40:60, bei - 7° etwa 15:85. Störung des Gleichgewichtes und Verschiebung desselben durch Festlegung der Triosephosphorsäure mittels Sulfit als Abfangmittel; auf diese Weise erfolgt am besten bei 60° restlose Umwandlung von Hexosediphosphorsäure in Dioxyacetonphosphorsäure (mittels Enzymextrakten aus tierischen Geweben)³.

Von Interesse ist sodann, daß bei der unter der Einwirkung der Aldolase vor sich gehenden Kondensation stets nur eine ganz bestimmte Konfiguration auftritt, und zwar stehen die Hydroxyle stets in trans-Stellung (wie auch bei der rein chemischen Kondensation mittels Alkali⁴), außerdem steht das Hydroxyl am C₃-Atom in der üblichen

¹ Derselbe entspricht dem Embden-Ester des Muskels.

² MEYERHOF und KIESSLING: Bioch. Z. 279, 40 (1935).

³ MEYERHOF und LOHMANN: Bioch. Z. 273, 413 (1934).

⁴ H. O. L. FISCHER und BAER: Helv. 19, 519 (1936).

Schreibweise immer links; nicht nur bei der Bildung der d-Fruktose-1-Phosphorsäure aus Dioxyacetonphosphorsäure und d-Glycerinaldehyd, sondern auch bei der Bildung der l-Sorbose-1-Phosphorsäure bei Verwendung von l-Glycerinaldehyd.

Die Aldolase selbst vermag ganz allgemein Aldolkondensationen von Aldehyden mit Dioxyaceton-Phosphorsäure zu bewirken¹. So reagiert dieselbe in Gegenwart von dialysiertem Muskel- oder Hefeextrakt außer mit Glycerinaldehyd auch mit Formaldehyd, Glycolaldehyd, Propionaldehyd, Milchsäurealdehyd, Methylglyoxal, Butyraldehyd, Phenylpropylaldehyd, Aldol².

12. Übung:

Bildung von Methylglyoxal (fünfte Vergärungsform).

a) **Demonstrationsversuch**³. 30 ccm einer 8%igen Lösung von Mg-Hexosediphosphat (2,4 g exsiccatorrockenes, etwa 1,6 g wasserfreies Salz), 0,5 g frische Bäckerhefe, 1—2 ccm Toluol, in einer Glasstöpselflasche gut durchgeschüttelt. Unter öfterem Umschütteln und Lüften des Stöpsels (besonders im Anfang) 1—2 Tage bei 37° stehen lassen. Erste Probe von 10 ccm nach 24 Stunden entnommen, falls nur geringe Mengen Reaktionsprodukt erhältlich, nach weiteren 24 Stunden wiederholt.

Nachweis des Methylglyoxals als 2,4-Dinitrophenylosazon⁴: 10 ccm Probe durch Zusatz von 2 ccm 20%iger Trichloressigsäure enteiweißt, und durch ein mit Kieselgur imprägniertes MACHÉREY-Filter (oder auch durch ein Barytfilter) filtriert; völlig klares Filtrat mit 2 ccm einer 1,6%igen Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n-Salzsäure versetzt: Trübung der Flüssigkeit, beim Umschütteln flockiger, orangefarbiger Niederschlag. Nach 1½ Stunden filtriert oder zentrifugiert, zunächst mit n/2 HCl, dann mit Wasser ausgewaschen, mit 3—5 ccm 25%iger Sodaauslösung (am Filter oder im Zentrifugenröhrchen) behandelt. (Im Sodafiltrat befindet sich eventuell gebildetes Brenztraubensäure-2,4-dinitrophenylhydrazon in Lösung.) Rückstand mit Wasser ausgewaschen. Man erhält praktisch reines Methylglyoxal-bis-2,4-Dinitrophenylhydrazon. Nachweis: In 0,5%iger alkoholischer Kalilauge lösen sich schon Spuren der Substanz sofort mit tief blauvioletter Farbe.

¹ Vgl. MEYERHOF, LOHMANN und SCHUSTER: Bioch. Z. **286**, 301, 319 (1936).

² LOHMANN: Angew. Chem. **49** 327 (1937).

³ NEUBERG und KOBEL: B. **63**, 1986 (1930).

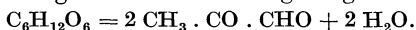
⁴ Hinsichtlich der Methylglyoxalabscheidung als Dioxim vgl. NEUBERG und SCHEUER [M. **53/54**, Wegscheider Festschr. 1031 (1929)], als Methylnaphthopyrazin vgl. NEUBERG und SCHEUER: B. **63**, 3068 (1930).

b) Gäransatz mit quantitativer Bestimmung des Methylglyoxals.

Hauptversuch (Ansatz I): 600 ccm 4,5%ige Magnesiumhexosediphosphatlösung, 10 g frische Bäckerhefe und 20 ccm Toluol. Vergleichsversuch (Ansatz II): 300 ccm Wasser, 5 g frische Bäckerhefe und 10 ccm Toluol. Beide Versuche mit Gäraufsatz verschlossen und bei 35—37° aufbewahrt¹. Nach 24 Stunden 100 ccm Probe entnommen, durch Zusatz von 10—20 ccm 10—20%iger Trichloressigsäure enteiweißt, klares Filtrat mit 20 ccm einer heißen salzsauren Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (1 g der Base gelöst in 60 ccm siedender 2 n-Salzsäure) versetzt. Trübung, später flockiger Niederschlag; nach etwa 2stündigem Stehen abgetrennt, wie oben mit Sodalösung von eventuell mit gebildetem Brenztraubensäure-2,4-Dinitrophenylhydrazon befreit, einmal mit etwa n/2-HCl, dann mit Wasser, schließlich mit etwas Alkohol gewaschen, nach dem Trocknen im Exsiccator gewogen². Weitere Probeentnahme und Bestimmung des Methylglyoxalgehaltes etwa alle 6 Stunden. Später findet Wiederabnahme der Methylglyoxalmenge statt. Im Vergleichsversuch überzeugt man sich, daß in Abwesenheit von Hexosediphosphat kein Methylglyoxal entsteht.

Anhang: Theoretisches.

Gärungsgleichung für die fünfte Vergärungsform:



Die fünfte Vergärungsform kommt dadurch zustande, daß die Dismutation des Triosephosphats gehemmt ist. Es kommt also wohl zum Zerfall des Hexosediphosphats unter der Einwirkung des Zymohexasesystems, doch kann das Triosephosphat nicht weiter umgewandelt werden, da die Oxydoreduktase bzw. deren Co-Ferment (die Co-Zymase) durch Toluol unwirksam gemacht wird. Nach MEYERHOF soll nun die Triosephosphorsäure ohne weitere Fermentwirkung (also rein chemisch) in Methylglyoxal übergehen. Das Auftreten des Methylglyoxals würde dann lediglich die primäre Bildung von Triosephosphorsäure anzeigen.

Hinsichtlich der Frage, wie weit eine Zuckerphosphorylierung für die Vergärung erforderlich ist, vgl. S. 143.

¹ Da ein Teil des entstehenden Methylglyoxals wegen nicht vollständiger Hemmung der Cozymasewirkung stets weiter verarbeitet wird, kann man diesen Anteil in Vergleichsversuchen ermitteln, indem man Methylglyoxallösungen mit der analogen Menge Hefe behandelt, und zwar: Ansatz III: 120 ccm 0,05—0,1%ige Methylglyoxallösung, 2 g frische Bäckerhefe und 4 ccm Toluol; Ansatz IV: 120 ccm Methylglyoxallösung (wie zuvor) mit 4 ccm Toluol; beide Versuche bei 35—37°. Probeentnahme und Bestimmung des Methylglyoxalgehaltes ergibt die Menge des durch die Hefe verarbeiteten Methylglyoxals.

² Zur weiteren Reinigung kann aus wenig Pyridin, dann aus Nitrobenzol umkrystallisiert werden; Fp. 298°.

13. Übung:

**Bildung von Brenztraubensäure und Glycerin
(vierte Vergärungsform).**

a) Demonstrationsversuch mit Hexosediphosphat¹. Ansatz und Durchführung genau wie in Übung 12 a, aber mit 3 g frischer Bäckerhefe.

Nachweis der Brenztraubensäure als 2,4-Dinitrophenylhydrazon. 10 ccm Probe wie in Übung 12 a vorbehandelt; nach dem Zusatz des 2,4-Dinitrophenylhydrazins und Umschütteln: Abscheidung eines hellgelben Niederschlages, der sich rasch als gelbes Pulver absetzt. Nach 1 Stunde genau so weiter behandelt wie in Übung 12 a. Sodafiltrat (dunkelbraun) mit HCl bis zum Farbumschlag nach hellgelb versetzt: Fällung des Brenztraubensäure-2,4-Dinitrophenylhydrazons als hellgelber Niederschlag; nach dem Absetzen filtriert, oder zentrifugiert, mit n/2-Salzsäure und Wasser nachgewaschen. Nachweis: In 0,5%iger alkoholischer Kalilauge lösen sich schon Spuren der Substanz mit roter, ins Bräunliche spielender Farbe².

b) Gäransatz mit Zucker unter quantitativer Bestimmung der Endprodukte³ (zugleich unter Verfolgung der Brenztraubensäurebildung). Hauptversuch (I): 200 ccm 18,5%ige Glucoselösung, 200 ccm m/8-Na₂HPO₄-Lösung und 10 g frische Oberhefe⁴ (Anfangs-p_H 7—8, End-p_H 5—7); Vergleichsversuch (II): 200 ccm 9,25%ige Glucoselösung, 5 g frische Oberhefe (Anfangs-p_H etwa 6, End-p_H etwa 3,1); beide Ansätze mit Gäraufsatz verschlossen. Je 4 ccm Probe aus I sowie II (nach vollständiger Suspendierung der Hefe) zwecks Bestimmung der entstehenden Kohlensäure in Eudiometer eingefüllt (am Ende des Versuches saugt man in diese etwas verdünnte Schwefelsäure ein, um alles CO₂ frei zu setzen). Zur Ermittlung der Selbstgärung werden 10 ccm Wasser mit 0,25 g der gleichen Hefe in ein Eudiometer eingefüllt. Gärtemperatur 37°. Verfolgung der Brenztraubensäurebildung: Entnahme von je 20 ccm Probe (aus Ansatz I) von der 10. Stunde an alle 2 Stunden; über Kieselgur filtriert, Filtrat für die ana-

¹ NEUBERG und KOBEL: B. 63, 1986 (1930).

² Die Färbung kann auch für quantitative colorimetrische Zwecke verwertet werden: Vgl. CASE: Biochem. J. 26, 753 (1932).

³ In Anlehnung an NEUBERG und KOBEL: Biochem. Z. 229, 446 (1930).

⁴ Diese ist gegen alkalische Reaktion weniger empfindlich als Unterhefe.

lytische Bestimmung der Brenztraubensäure verwendet. Versuchsabbruch, sobald das Maximum erreicht ist (später findet wieder Abnahme der Brenztraubensäuremenge statt).

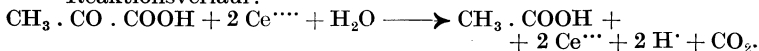
*Bestimmung der Brenztraubensäure*¹: 20 ccm Filtrat werden mit 1 ccm Eisessig versetzt und sodann mit 5 ccm einer 0,5-molaren Bleiacetatlösung gefällt. Niederschlag über Kieselgur abfiltriert, überschüssiges Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt. Im völlig klaren Filtrat wird die Brenztraubensäure oxydimetrisch titriert: Zwei ERLÉNMEYER-Kolben (50 ccm Inhalt) mit je 15 ccm Cerisalzlösung (gesättigte Lösung von Cerisulfat in n-Schwefelsäure); in den einen Kolben fügt man 10 ccm Probe, die mit Schwefelsäure deutlich angesäuert ist² (enthaltend 4—20 mg Brenztraubensäure); es wird 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen³. Inzwischen titriert man die Kontrollprobe mittels n/10-Ferrosulfatlösung (MOHRsches Salz, gegen KMnO_4 gestellt) unter Anwendung von Kaliumferricyanidlösung als Indikator (2 Tropfen Lösung)⁴. Sodann wird die Hauptprobe zurücktitriert⁵. Titrationsverlauf: Entfärbung der gelben Flüssigkeit, Umschlagspunkt grün; weiterer Zusatz von 1 Tropfen Ferrosulfatlösung erzeugt intensive Blaufärbung. Berechnung: mg Brenztraubensäure = $44 \cdot (N-n)t$; N = ccm Ferrosulfatlösung in der Kontrollprobe, n in der Hauptprobe, t = Titer der Ferrosulfatlösung.

Bestimmung der sonstigen Reaktionsprodukte im Filtrat (bei Versuchsabbruch): Zucker, Alkohol, Acetaldehyd und Glycerin in üblicher Weise, auch im Vergleichsversuch. Das Ausmaß, in dem nebstbei die erste Vergärungsform vor sich gegangen ist, ergibt sich aus den Werten für Alkohol und CO_2 ; falls auch Acetaldehyd vorhanden ist, so ist nur der Alkoholwert maßgebend.

¹ Nach FROMAGEOT und DESNUELLE: Biochem. Z. **279**, 174 (1935).

² Die Ansäuerung ist notwendig, um die Brenztraubensäure völlig in die Ketoform überzuführen.

³ Reaktionsverlauf:

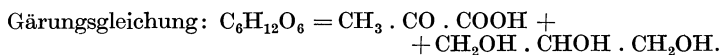


In derselben Weise reagieren auch andere α -Ketosäuren.

⁴ Die Indikatorlösung muß frisch bereitet werden, und zwar durch Lösen eines stecknadelkopfgroßen Krystalls in 5 ccm destilliertem Wasser.

⁵ Mikrobestimmung: Probe mit 0,4—2 mg Brenztraubensäure. Cerisalzlösung wie oben bereitet, aber unmittelbar vor Verwendung mit n-Schwefelsäure auf das zehnfache verdünnt; Titration mit einer Mikrobürette (Graduierung 0,01 ccm).

Anhang: Theoretisches.



Bildung der Reaktionsprodukte daher in äquivalenten Mengen; bei Anwendung frischer Hefen überwiegt Glycerin, da die Brenztraubensäure teilweise im internen Hefestoffwechsel verwendet wird. Neben der vierten Vergärungsform findet bei Anwendung von freiem Zucker stets auch normale Vergärung statt (vgl. Übung 13b).

Substrate: Hexosediphosphat wie auch freier Zucker. Die Spaltung des Hexosediphosphats führt dabei über die Triosephosphate, die dann weiter umgewandelt werden.

Fermentmaterialien: Frische Hefen, Trockenhefen, Alkohol-Äther-Trockenpräparate sowie Macerationssäfte von Unterhefen.

Bedingungen für die Verwirklichung der vierten Vergärungsform: Abtönung der Wasserstoffionenkonzentration (pH etwa 7–8, Zusatz von Trimagnesiumphosphat, Dinatriumphosphat oder MgO), Verringerung der Fermentmenge und eventuell Verkürzung der Gärdauer. Bei Anwendung von verdünntem Hefemacerationssaft und Hexosediphosphat verläuft die Spaltung nach der vierten Vergärungsform bis zu 100% d. Th.¹ Einfachste Art der Brenztraubensäurebildung: Einwirkung von frischer Bäckerhefe auf Hexosediphosphat in Gegenwart von plasmolytischen Mitteln (vgl. Übung 13a).

14. Übung:

Darstellung der Phosphoglycerinsäure.

Ansatz²: 700 ccm $\frac{2}{3}$ mol. Phosphatlösung (pH 6,6), 560 ccm 3%ige Na-Hexosediphosphatlösung, 840 ccm 2%ige Acetaldehydlösung, 560 ccm 20%ige Zuckerlösung, 140 ccm 0,2 mol. Natriumfluoridlösung, 700 g frische Unterhefe (vgl. Nachtrag) und 70 ccm Toluol³. In einem 5 l-Kolben gemischt, mit Gäraufsatz verschlossen und bei 37° unter öfterem Umschütteln etwa 3½ Stunden belassen (falls Gärung eintritt, muß mehr Toluol zugesetzt werden). Die Menge der Phosphoglycerinsäure bestimmt man eventuell kolorimetrisch⁴.

Aufarbeitung: Nach dem Abtrennen der Hefe (durch Absaugen oder besser durch Zentrifugieren) wird die Flüssigkeit mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht, und mit der erforderlichen Menge 20%iger Mg-Acetatlösung das anorganische Phosphat ge-

¹ KOBEL und SCHEUER: Biochem. Z. **229**, 238 (1930).

² Nach VERCELLONE und NEUBERG: Biochem. Z. **280**, 161 (1935).

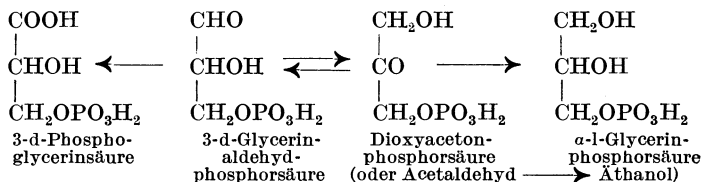
³ Man kann auch ohne Zusatz von Hexose-diphosphat arbeiten, jedoch darf dann das Toluol erst nach lebhafter Angärung (Phosphorylierung) hinzugefügt werden. Vgl. OSTERN u. GÜTHKE: H. **248**, 155 (1937).

⁴ RAPAPORT: Bio. Z. **289**, 406; **291**, 429 (1937).

fällt. Filtrat mit Essigsäure neutralisiert, mit 370 ccm Eisessig und 175 ccm 50%iger Ba-Acetatlösung versetzt, von einem rasch entstehenden flockigen Niederschlag abfiltriert. Lösung nach kräftigem Anreiben 1½ Tage im Eisschrank aufbewahrt, wobei Krystallisation stattfindet; man erhält etwa 30 g Rohprodukt. Filtrat mit der gleichen Menge vergälltem Alkohol versetzt (falls im Eisschrank keine Krystallisation stattfindet, wird gleich mit Alkohol gefällt). Nach 24 Stunden Niederschlag abgetrennt und mit 700 ccm Wasser unter Umrühren gewaschen. *Reinigung des Ba-Salzes*: Rückstand mit 2 n-Salzsäure digeriert (bis zur kongosaueren Reaktion), unlöslicher Anteil abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet (etwa 2 g) (man erhält 3-phosphoglycerinsaures Ba); salzsaure Lösung mit Natronlauge abgestumpft (schwach kongosauer), mit 25% des Volumens an Alkohol versetzt: Abscheidung des reinen Ba-Salzes (aus 18—19 g Rohprodukt erhält man dabei 15 g reines Ba-Salz). Gesamt-ausbeute 35—45 g an reinem 3-phosphoglycerinsaurem Barium¹. Das Ba-Salz der 2-Phosphoglycerinsäure bleibt dabei in Lösung².

Anhang I: Bildungsweise und Umwandlung der Phosphoglycerinsäure.

1. Bildungsmechanismus der Phosphoglycerinsäure. Zunächst findet Phosphorylierung statt unter Bildung von Hexosediphosphorsäure, sodann Zerfall dieser in Triosephosphorsäure und schließlich Oxydoreduktion der letzteren unter Bildung von Phosphoglycerinsäure und Glycerinphosphorsäure. Die Wasserstoff-Acceptorfunktion der Dioxyacetonphosphorsäure kann unter entsprechender Steigerung der Ausbeute an Phosphoglycerinsäure durch Acetaldehyd übernommen werden (unter Umwandlung dieses in Äthanol). Grundbedingung für die Anhäufung von Phosphoglycerinsäure ist die Gegenwart von Natriumfluorid, da dieses die weitere Umwandlung der Phosphoglycerinsäure hemmt (vgl. unten).



Die Richtigkeit dieser Reaktionsfolge geht daraus hervor, daß die Phosphoglycerinsäure ebenso wie die Glycerinaldehydphosphor-

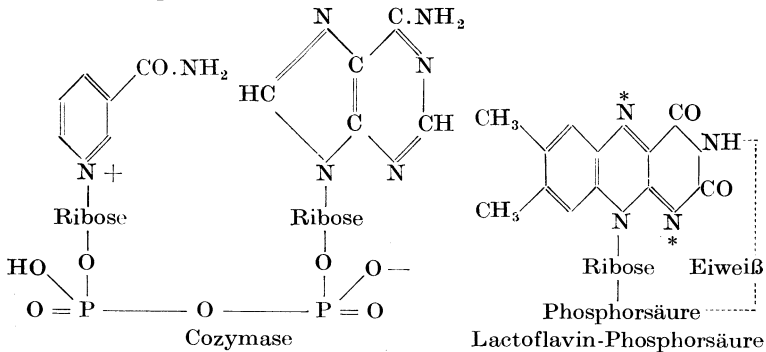
¹ Nach den früheren Vorschriften erhält man nur etwa den dritten Teil; vgl. NEUBERG und KOBEL: *Angew. Chem.* **46**, 220, 711 (1933); *Biochem. Z.* **260**, 241 (1933); **263**, 219 (1933); **264**, 454 (1933).

² Vgl. MEYERHOF und KIESSLING: *Biochem. Z.* **276**, 239 (1935).

säure der d-Reihe angehört, die Glycerinphosphorsäure dagegen der l-Reihe; sie ist daher nur von der Dioxyacetonphosphorsäure ableitbar.

2. Das Fermentsystem der Oxydoreduktion. Dasselbe katalysiert im Rahmen der alkoholischen Gärung in erster Linie die in obenstehendem Formelbild wiedergegebenen Reaktionen, die einerseits zur Bildung der Phosphoglycerinsäure und andererseits zur Bildung von Glycerinphosphorsäure bzw. Äthanol führen.

Die Wirkungsgruppe der Oxydo-reduktase (*Dehydrase I*)¹ ist die Co-Zymase, die ein Pyridin-nucleotid vorstellt. Sie ist ähnlich wie die Co-Phosphorylase äußerst leicht abdissoziierbar und hat daher einen recht weiten Spezifitätsbereich, je nachdem an welchem Protein-träger (Apoferment) sie gerade verankert ist. 1 kg frische Hefe enthält ungefähr 500 mg Co-Zymase, also sehr viel². In Colibakterien ist sogar doppelt soviel vorhanden³.



Die Co-Zymase wirkt durch die Aufnahme von H_2 dehydrierend, wobei sie sich in das Dihydropyridin-nucleotid umwandelt², das im stationären Zustand der Gärung durch Acetaldehyd wieder reoxydiert wird. (Vgl. auch Nachtrag.) In gewissen Phasen wie bei der Angärung scheint aber diese Reoxydation durch das gelbe Ferment verursacht zu werden, das spezifisch auf diese Reaktion eingestellt ist⁴.

¹ MEYERHOF und OHLMEYER: Bio. Z. **290**, 334 (1937). — Vgl. dazu die Zusammenfassung von H. v. EULER: Erg. Physiol. **38**, 1 (1936).

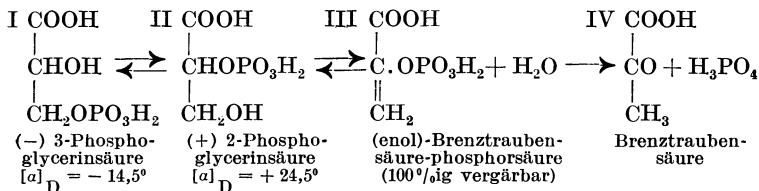
² Hinsichtlich der Isolierung derselben in Substanz und Umwandlung in die Dihydro-co-zymase vgl. besonders OHLMEYER: Bio. Z. **297**, 66 (1938). — Die H_2 -Aufnahme erfolgt an der dem Pyridin-N benachbarten Doppelbindung.

³ ENDO: Bio. Z. **296**, 56 (1938).

⁴ Außerdem oxydiert dasselbe auch ein anderes Dihydropyridin-nucleotid, nämlich das WARBURGSche Co-Ferment, das ein Molekül Phosphorsäure mehr hat als die Co-Zymase. Dasselbe ist die Wirkungsgruppe des sogenannten „Zwischenfermentes“ (Dehydrase II) und vermag Glucose-6-Phosphorsäure über Phosphohexonsäure bis zu CO_2 zu oxydieren. Vgl. WARBURG: Bio. Z. **287**, 440 (1936); **292**, 287 (1937) und frühere Arbeiten.

Das Co-Ferment des gelben Fermentes ist die Lactoflavin-Phosphorsäure, die jedoch an ihrem Eiweißträger recht fest verankert ist¹. Die Wirkungsweise derselben als H₂-Acceptor beruht auf der Aufnahme von Wasserstoff an den mit * bezeichneten Stellen.

3. Zusammensetzung und Zerfall der Phosphoglycerinsäure. Die Phosphoglycerinsäure von NILSSON² besteht aus zwei Komponenten³, nämlich einem α - und einem β -ständig phosphorylierten Anteil. Die Umwandlung der Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure erfolgt daher gemäß dem folgenden Schema:



Enzymatisches Gleichgewicht I \rightleftharpoons II von beiden Seiten aus rasch erreichbar; dasselbe ist gemäß den neuesten Befunden nur wenig temperaturabhängig. Der Anteil der (+) 2-Phosphoglycerinsäure am Gleichgewichtsester beträgt bei 0° 8,5%, bei 60° 11,6%, bei ansteigender Temperatur wird trotz Anwesenheit von NaF auch bereits etwas Phosphobrenztraubensäure gebildet⁴. Die Reaktion wird durch die Phosphoglyceromutase katalysiert, deren Wirkungsgruppe nicht oder nur sehr schwer abdissoziierbar, und daher noch unbekannt ist.

Das Gleichgewicht II \rightleftharpoons III ist temperaturunabhängig. Diese Reaktion II \longrightarrow III wird durch NaF gehemmt; daher wird die einmal gebildete Phosphoglycerinsäure in Gegenwart von Natriumfluorid nicht weiter verändert. Diese Reaktion wird durch die Enolase katalysiert, für die dasselbe gilt wie für die Phosphoglyceromutase.

Die Reaktion III \longrightarrow IV wird durch das Phosphorylasesystem katalysiert und ist mit den Phosphorylierungen des Zuckermoleküls gekoppelt⁵ (vgl. S. 132).

Anhang II: Übersicht des Gärungsschemas.

1. Der Zuckerabbau und die daran beteiligten Fermente. Die Abbaustufen der alkoholischen Gärung durch Hefe gehen gemäß MEYERHOF in folgender Reihenfolge vor sich:

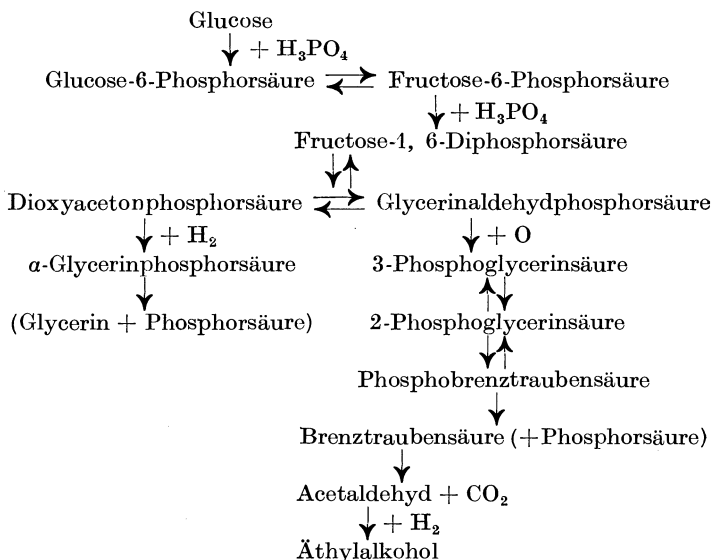
¹ Daher auch die enge Substratspezifität derselben.

² Ark. Kem. Min. Geol. (schwed.) (A) 10, Nr 7 (1930).

³ MEYERHOF und KIESSLING: Naturwiss. 22, 838 (1934); Biochem. Z. 276, 239 (1935).

⁴ MEYERHOF und SCHULZ: Bio. Z. 297, 60 (1938).

⁵ Über die Koppelung zwischen der Oxydoreduktion und der Phosphorylierung vgl. MEYERHOF, OHLMEYER und MÖHLE: Bio. Z. 297, 90, 113 (1938).



Sobald einmal auf diesem Wege Acetaldehyd entstanden ist, so übernimmt derselbe im Oxydoreduktionsvorgang die Rolle der Dioxyacetonphosphorsäure, so daß es nicht mehr zur Bildung von Glycerin kommt. Wird dagegen der Acetaldehyd dem Reaktionssystem entzogen (abgefangen usw. wie bei der zweiten und dritten Vergärungsform) so muß es dauernd zur weiteren Bildung von Glycerin kommen.

Der *Enzymkomplex der alkoholischen Gärung* (die Zymase) besteht aus folgenden Teilfermenten (bzw. Fermentsystemen):

a) Das Phosphorylierungssystem katalysiert die einleitenden Reaktionen, die zugleich mit der Spaltung der Phosphobrenztraubensäure gekoppelt sind; auch hier ist das Phosphorylasesystem wirksam. Als Co-Ferment wirkt das Adenylsäureystem.

b) Das Zymohexasesystem katalysiert den Zerfall der Hexosediphosphorsäure (sowie den umgekehrten Prozeß: Aldolase), die Isomerisierung der Hexosemonophosphate (Phosphohexomutase) und der Triosephosphorsäuren. Co-Fermente hier nicht abdissoziierbar und unbekannt.

c) Das Oxydoreduktionssystem bewirkt die Dismutation der Triosephosphorsäuren sowie der Glycerinaldehydphosphorsäure mit dem Acetaldehyd. Das Co-Ferment ist hier die Co-Zymase.

d) Die Phosphoglyceromutase katalysiert die Isomerisierung der beiden Phosphoglycerinsäuren. Co-Ferment schwer abdissoziierbar und unbekannt.

e) Die Enolase katalysiert den reversiblen Vorgang: 2-Phosphoglycerinsäure Phosphobrenztraubensäure. Co-Ferment unbekannt.

f) Mit Hilfe der Carboxylase geht die Decarboxylierung der Brenztraubensäure vor sich. Das Co-Ferment ist die Äneurindiphosphorsäure.

2. Der Verlauf der alkoholischen Gärung in der lebenden Zelle.

MEYERHOF nimmt an, daß die alkoholische Gärung auch in der lebenden Zelle im wesentlichen in gleicher Weise verläuft wie im Macerationsssaft, also gemäß seinem Gärungsschema. Dagegen wies besonders NILSSON¹ auf die Unterschiede im Gärverlauf in den zellfreien Zymasystemen einerseits (Macerationssaft usw.) und in den intakten Zymasystemen andererseits hin (lebende Hefe, intakte Trockenhefe), wobei bekanntlich durch die erst genannten der Zucker nur zur Hälfte vergoren wird. So sieht auch KLUYVER² die isolierbaren Hexosephosphorsäuren nur als Stabilisierungsprodukte an, die sich bei der zellfreien Gärung ansammeln, da dabei die in der lebenden Zelle herrschende Harmonie gestört ist. Außerdem ist zu beachten, daß die lebende Hefe im stationären Zustand der Gärung keine Hexosephosphorsäuren vergärt. KLUYVER nimmt an, daß in der lebenden Zelle aktive Hexosemonophosphorsäure unter Bildung von Triosephosphorsäure und freier Triose zerfällt und daß die letztere dann über Methylglyoxalhydrat der abschließenden Oxydoreduktion unterliegt. Jedenfalls ist hier noch keine endgültige Entscheidung gefallen. — Nach Auffassung von WILLSTÄTTER und ROHDEWALD³ geht der Phosphorylierung durch lebende Hefe eine Glykogensynthese voraus. — Vgl. ferner Nachtrag.

Weiterhin muß auch noch die alkoholische Gärung bei anderen Organismen berücksichtigt werden. So konnten NORD und Mitarbeiter⁴ zeigen, daß *Fusarium lini* imstande ist, Hexosen wie Pentosen in einer mit der Hefegärung übereinstimmenden Weise abzubauen, ohne daß dieser Vorgang durch eine Veresterung mit organischem Phosphat in der lebenden Zelle eingeleitet wird; doch kann derselbe später von ihr begleitet sein, wobei aber den Phosphorsäureestern lediglich eine Funktion beim Zellneubau zugeschrieben wird. — Ähnliches dürfte wohl auch für den Stoffwechsel anderer Organismen gelten.

3. Aktivatoren der Gärung der lebenden Zelle. Hierher gehören vor allem die Z-Faktoren v. EULERS, die Steigerung der Gärungsgeschwindigkeit ohne Vermehrung der Zellenzahl bewirken⁵. Gewinnung derselben aus Brauereiunterhefe oder aus Weinhefe⁶. Sie kommen auch im Traubensaft sowie vielen tierischen Geweben vor. Dieselben sind durch Behandlung mit Pb-Acetat in zwei thermostabile Faktoren zerlegbar (Z_1 und Z_2) und weder mit Bios noch mit Vitamin B_2 identisch⁷. — Wuchsstoffe wie Biotin beeinflussen die Gärung nicht. Hinsichtlich Beziehungen zwischen Z-Faktor und

¹ Vgl. die Zusammenfassung von NILSSON: Arch. f. Biol. 8, 353 (1937).

² KLUYVER: Erg. d. Enzymf. 4, 230 (1935).

³ WILLSTÄTTER und ROHDEWALD: H. 247, 269 (1937). Vgl. auch GRÜSS: Z. f. d. ges. Brauwesen 27, 686 u. a. (1904).

⁴ Bioch. Z. 258, 241 (1936); 293, 231 (1937). — Das oben Gesagte gilt auch für Disaccharide: NORD und ENGEL: Bioch. Z. 296, 153 (1938).

⁵ H. v. EULER und SWARTZ: H. 140, 146 (1924); H. v. EULER und MYRBÄCK: H. 141, 297 (1924).

⁶ BRISCOU und GENEVOIS: C. r. Soc. brol. 107, 865 (1931).

⁷ PHILIPSON: H. 193, 15, 181 (1930). — H. v. EULER und PHILIPSON: H. 195, 81 (1931); 198, 1 (1931).

Bios vgl. EULER und LARSSON¹. Von Interesse ist ferner, daß sich der Z-Faktor von den Wuchsstoffen in der Weise trennen läßt, daß Würze mit Preßhefe ausgeschüttelt wird. Dabei werden die Wuchsstoffe völlig entfernt, der Z-Faktor nur zu 50%. Aminosäuren, die das Wachstum beeinflussen, haben keine Z-Wirkung². Dagegen soll die Wirkung von Z-faktor-freien Mehlextrakten auf Aminosäuren und Polypeptide zurückzuführen sein³.

D. Acyloinsynthesen und Hydrierungen bei der Hefegärung.

15. Übung:

Darstellung von Phenylacetylcarbinol.

a) Analytischer Versuch: Isolierung des Phenylacetylcarbinols mittels Derivaten. 10 g Rohrzucker und 10 g abgepreßte Hefe in 200 ccm Wasser in üblicher Weise angären lassen, in einem mit doppelt durchbohrtem Gummistöpsel versehenen Kolben; in der einen Bohrung Gäraufsatz, in der anderen eine oben mit Hahn versehene Pipette; durch diese läßt man allmählich 1 ccm frisch destillierten Benzaldehyd eintropfen. Der Ansatz bleibt bis zum Aufhören der Gärung bei Zimmertemperatur stehen. Probe auf Zucker: Weiterer Zusatz von 2 g Hefe und Feststellung, ob noch Gärung stattfindet⁴. Aufarbeitung: Filtration des Gärgutes, Auffüllung auf 250 ccm. Probeentnahme für die Darstellung von Derivaten des Phenylacetylcarbinols.

Thiosemicarbazon (zur quantitativen Bestimmung geeignet; $C_9H_{10}O:N.NH.CS.NH_2$). 100 ccm Filtrat mit einer Lösung von 0,25 g Thiosemicarbazid in 5 ccm Wasser versetzt und stehen gelassen. Krystalle abgesaugt, getrocknet, Menge ermittelt, Schmelzpunkt festgestellt. Aus absolutem Alkohol umkrystallisiert, Schmelzpunkt 204—205° (bei schnellem Erhitzen) unter Zersetzung. Abscheidung in etwa 90%iger Ausbeute.

Phenylhydrazon ($C_9H_{10}O:N.NH.C_6H_5$). 50 ccm Filtrat mit einer Lösung von 0,5 ccm Phenylhydrazin (in 5 ccm etwa 50 proz. Essigsäure) versetzt: gelblicher Niederschlag, nach dem Trocknen aus Benzol-Petroläther wiederholt umkrystallisiert, Schmelzpunkt 96°. $[\alpha]_D = -164,2^{\circ}$ in Benzol, bzw. $+217,8^{\circ}$ in Alkohol.

¹ H. v. EULER und LARSSON: H. 223, 189 (1934).

² HARTELIUS und NIELSEN: Compt. rend. Lab. Carlsberg 22, 281 (1938).

³ GEOFFREY und LABOUR: Bl. Soc. Chim. Biol. 19, 922 (1937).

⁴ Prüfung mittels FEHLINGScher Lösung nicht möglich, da Reaktionsprodukt auch reduziert.

p-Nitrophenylosazon [$C_9H_8(:N.NH.C_6H_4NO_2)_2$]. Ansatz wie zuvor. $2\frac{1}{2}$ Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt: dunkelroter Niederschlag, abgesaugt, mit verdünnter Essigsäure, dann mit Alkohol und Äther gewaschen, aus Nitrobenzol + Eisessig umkrystallisiert, purpurrote Nadelchen vom Schmelzpunkt 264 bis 265°.

b) Präparativer Versuch: Reindarstellung des Phenylacetylcarbinols¹. Apparatur (vgl. Abb. 9, S. 73): WOLFFsche Flasche von 10 l Inhalt, versehen mit Rührwerk (Rührverschuß mit Wasser gefüllt, wirkt als Gäraufsatz), Bürette, Tropftrichter und Hahn zur Probeentnahme. Raumtemperatur. Gäransatz: 300 g Rohrzucker und 300 g abgepreßte Hefe (Brennereihefe oder auch Bierhefe) in 6 l Leitungswasser. Nach dem Angären Zusatz von 30 g frisch destilliertem benzoessäurefreiem Benzaldehyd im Laufe von einigen Stunden aus der Bürette. Nach etwa 2—3 Tagen (Aufhören der CO_2 -Entwicklung) wird noch etwas frische Hefe zugesetzt und festgestellt, ob die Gärung beendet ist. Falls während des Prozesses Unterbrechung der Gärung stattfindet, kann dieselbe durch Zusatz von frischer Hefe wieder in Gang gebracht werden. Man kann einige derartige Gäransätze durchführen und die Reaktionsprodukte vereinigen, oder man benutzt eine größere Apparatur, und zwar einen etwa 30—60 l fassenden Glasballon, mit dem in Abb. 10 wiedergegebenen Aufsatz (vgl. S. 73).

Aufarbeitung: Gärgut zentrifugiert. Lösung drei- bis viermal mit Äther ausgeschüttelt; Auszüge vereinigt, etwa $\frac{2}{3}$ des Äthers abdestilliert, Rest rasch zweimal mit je etwa 30 ccm gesättigter Sodalösung (für einen Ansatz mit 30 g Benzaldehyd) und sodann zweimal mit ebensoviel Wasser ausgeschüttelt. Vereinigte wäßrige Anteile (Säurefraktion) nochmals ausgeäthert. Ätherauszug mit der Hauptmenge vereinigt. Die entsäuerte ätherische Lösung fünf- bis sechsmal je $\frac{1}{2}$ Stunde mit je 60 ccm einer etwa 25%igen Na-Bisulfitlösung ausgeschüttelt (für je 30 g angewendeten Benzaldehyd); die vereinigten Bisulfitlösungen nochmals mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten ätherischen Extrakte von Äther befreit (Alkoholfraktion). Acyloinfraktion (Sulfitlösung): zunächst mit festem Natriumcarbonat, zum Schluß mit Natriumbicarbonat versetzt, solange noch CO_2 -Entwicklung erfolgt. Sodann fünfmal mit Äther ausgeschüttelt, Extrakte vereinigt, über geglühtem Natriumsulfat getrocknet, Äther abdestilliert. Rückstand im Vakuum fraktioniert destilliert. Aus 60 g Benzaldehyd erhält man

¹ Vgl. NEUBERG und HIRSCH: Biochem. Z. 115, 282 (1921). — NEUBERG und OHLE: Biochem. Z. 128, 610 (1922).

etwa 10—14 g l-Phenylacetylcarbinol vom K_{p12} 124—125°. Alkoholfraktion im Vakuum destilliert; man erhält Benzylalkohol und eine kleine Menge Methylphenylglykol.

Anhang: Theoretisches.

Acyloinkondensationen werden bewerkstelligt durch: Frische ober- und untergärrige Hefen, sowie deren Trockenpräparate und Macerationssäfte, ferner durch ein aus den Macerationssäften erhaltliches Trockenpräparat (dessen Wirksamkeit bei viermonatlicher Aufbewahrung kaum geändert wird¹).

Außer Benzaldehyd erwiesen sich noch folgende aromatischen Aldehyde zur Acyloinbildung geeignet: o-Chlorbenzaldehyd und Anisaldehyd², ferner o- und p-Tolylaldehyd³.

Während nach NEUBERG an der Acyloinkondensation ein eigenes Enzym (die Carboligase) beteiligt sein soll, wofür besonders die Bildung optisch aktiver Reaktionsprodukte spricht⁴, nimmt DIRSCHERL an, daß die Reaktion lediglich unter dem Einfluß des bei der Gärung entstehenden naszenten Acetaldehyds zustande kommt, vgl. S. 155.

16. Übung:

Darstellung von Acetoin.

a) Analytischer Versuch: Isolierung des Acetoin's mittels Derivaten. 10 g Rohrzucker und 20 g abgepreßte Bierhefe in 100 ccm Leitungswasser bei Zimmertemperatur angären lassen, innerhalb $\frac{1}{2}$ Stunde allmählich 20 ccm einer 10%igen Acetaldehydlösung (= 2 g) eintropfen gelassen (wie in Übung 15 a) öfters umgeschüttelt. Nach Beendigung der Gärung (5—7 Tage) überzeugt man sich durch erneuten Zusatz von etwa 4 g abgepreßter Hefe, daß der Zucker verbraucht ist. Gärgut filtriert und auf 200 ccm aufgefüllt.

Acetoin-p-Nitrophenylosazon $[\text{CH}_3 \cdot \text{C}(:\text{N} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2) \cdot \text{C}(:\text{N} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NO}_2)\text{CH}_3]$: 10 ccm des Filtrates mit 0,7 g p-Nitrophenylhydrazin in 7 ccm 50%iger Essigsäure versetzt, 1—2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Das Osazon abgesaugt, getrocknet und gewogen (etwa 0,2—0,3 g vom Schmelzpunkt 308—312°), Umkrystallisieren aus Pyridin-Eisessig; leuchtend rote Nadeln vom Schmelzpunkt 319°.

¹ Vgl. STEPANOW und KUSIN: B. 63, 1147 (1930).

² NEUBERG und LIEBERMANN: Biochem. Z. 121, 311 (1921).

³ BEHRENS und IWANOFF: Biochem. Z. 169, 478 (1926).

⁴ Vgl. auch TOMIYASU: Bio. Z. 289, 97 (1936); 292, 234 (1937).

*Quantitative Bestimmung des Acetoins durch Darstellung des Nickeldimethylglyoxims*¹: In einem 250 ccm fassenden, mit eingeschliffenem Glasstöpsel verschließbaren Destillierkolben² wird ein Gemisch von 25 ccm Probe, die nicht mehr als 50 mg Acetoin enthalten soll, nach Zusatz von 5 g krystallisiertem Ferrosulfat und 25 ccm 30%iger Ferrichloridlösung mit kleiner Flamme erwärmt, so daß die Temperatur während 15—20 Minuten langsam bis zum Siedepunkt ansteigt. Das Destillat wird in folgendem Reagens aufgefangen (in der Weise, daß das Kühlrohr gerade unter die Oberfläche reicht): 25 ccm Wasser, 3 ccm 10%ige Nickelchlorürlösung, 2 ccm 20%ige Hydroxylaminchlorhydratlösung, 5 ccm 20%ige NH₄Cl-Lösung. Das Ganze befindet sich in einem eisgekühlten 200 ccm ERLLENMEYER-Kolben. Im Laufe von etwa 30 Minuten werden 30 ccm abdestilliert, dann fügt man tropfenweise unter Umschwenken 0,5 ccm 20%iges Ammoniak zu. Bei größeren Mengen Acetoin tritt Gelbfärbung und bald Abscheidung des Niederschlages ein. Findet auch bei weiterem Zusatz von 0,3 ccm 20%igen Ammoniaks keine Farbänderung statt, so verschließt man und läßt 12—24 Stunden stehen. — Sodann wird der durch einen Gummistopfen mit eingeklemmtem Filtrierpapierstreifen verschlossene Kolben in einem Wasserbad allmählich bis zum Sieden desselben erhitzt, 1½ Stunde auf 100° gehalten, abgekühlt und 1 Stunde in Eis stehen gelassen. Man filtriert durch einen Tiegel mit Glassinterboden (SCHOTT 1 G 3), wäscht mit 100 ccm eiskaltem Wasser nach, trocknet ½ Stunde bei 110° und wägt nach ½stündigem Erkalten im Exsiccator. 1 g des Niederschlages entspricht 0,61 g Acetoin.

b) Präparative Gewinnung von Acetoin³. In einer WOLFFSchen Flasche von 10 l Inhalt, die mit einem Rührwerk und einem Tropftrichter zum Zulaufen des Acetaldehyds versehen ist, werden bei Zimmertemperatur 4 l einer 12—15%igen Zuckerlösung im Laufe einer halben Stunde allmählich mit 500 g abgepreßter und

¹ Nach der neuesten Methode von KNIPHORST und KRUISHEER: Z. Unt. Leb. **73**, 1 (1937). — Vgl. auch die Methode von LANGLYKKE und PETERSON [Ind. Eng. Chem. **29**, 163 (1937)], die auf der Destillation des Acetylmethylcarbinols und Titration desselben mittels der Jodoformreaktion beruht. — Hinsichtlich der Acetoinbestimmung in Gegenwart größerer Acetaldehydmengen vgl. LANGENBECK, WREDE und SCHLOCKERMANN: H. **227**, 263 (1934).

² Zur Verhinderung des Überschäumens kann erforderlichenfalls in den Hals des Kolbens ein Ring mit Drahtgaze oder einem anderen dünnen Drahtgeflecht eingesetzt werden.

³ Nach nicht veröffentlichten Versuchen mit R. HOFMANN: Diss., Prag 1937.

gewaschener Bierhefe (verrührt mit insgesamt etwa 1 l Wasser) versetzt. Dabei kommt eine lebhafte Gärung in Gang. Nach einer weiteren $\frac{1}{2}$ Stunde beginnt man mit dem Acetaldehydzusatz, und zwar läßt man im Laufe von etwa 6—7 Stunden 1000 ccm einer 10%igen Acetaldehydlösung zufließen; der Zusatz wird so geregelt, daß die Gärung nicht unterbrochen wird. Nach ungefähr 24 Stunden läßt dieselbe nach und ist nach etwa 48 Stunden praktisch beendet. Durch neuerlichen Zusatz von beiläufig 100 g Hefe überzeugt man sich, ob noch Gärung stattfindet und läßt dann vollkommen ausgären. Während des ganzen Prozesses bleibt das Rührwerk in Gang. An einer filtrierten Probe ermittelt man die Menge an Acetoin (vgl. oben). Der Rest wird nach dem Abzentrifugieren oder Absaugen der Hefe im Vakuum destilliert und der Acetoingehalt an einer Probe ermittelt. Das Destillat wird sodann mit Kochsalz oder Natriumsulfat gesättigt und mehrmals mit Chloroform extrahiert¹. Der Extrakt wird mit Calciumchlorid gut getrocknet, vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand im Vakuum destilliert. Kp_{120} 89°, unter Atmosphärendruck 144°. Beim Stehenlassen des reinen Produktes unter CO_2 scheidet sich nach einigen Tagen das dimolekulare Produkt in krystallisierter Form ab. Umkrystallisieren aus Aceton. Schmelzpunkt 95—96° (unter Umwandlung in die monomolekulare Form). Das Produkt zeigt l-Drehung.

17. Übung.

Hydrierung von Aldehyden.

a) Reduktion des Valeraldehyds zu Amylalkohol². In einer mit Rührwerk versehenen WOLFFSchen Flasche von 10 l Inhalt werden 4 l einer 10%igen Rohrzuckerlösung durch Zusatz von 400 g gewaschener und abgepreßter Bierhefe zur kräftigen Angärung gebracht und sodann 36 g Valeraldehyd innerhalb 4 Stunden unter kräftigem Rühren eintropfen gelassen; das Tempo des Eintropfens ist so zu regulieren, daß die Gärung nicht unterbrochen wird. Sodann wird unter weiterem Rühren bis zum Verschwinden des Zuckers (Probe mit FEHLINGScher Lösung) bei Zimmertemperatur stehen gelassen (etwa 5 Tage).

Aufarbeitung: Durch Destillation etwa 2800 ccm übergetrieben, diese nochmals destilliert (etwa 1500 ccm), zur Trennung der

¹ Gemäß den Angaben von TOMIYASU [Bl. Agr. Chem. Soc. Japan **13**, Nr 11 (1937)] für die Isolierung von Acetoin aus einer durch *B. lactis aerogenes* (vgl. S. 185) vergorenen Lösung.

² Vgl. NEUBERG und GORR, in OPPENHEIMER und PINCUSSEN, Methodik der Fermente, S. 1212. Leipzig: Thieme 1929.

Schichten Pottasche zugesetzt, die obere Schichte abgehoben, der wäßrige Anteil mit Äther ausgeschüttelt, Ätherextrakt mit der oberen Schichte vereinigt, mit frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet; Äther auf hoher Kolonne abdestilliert, dann geht Äthanol und schließlich bei 125° Amylalkohol über. Rektifikation desselben, Kp. 127—132° (etwa 20—24 g, Ausbeute 60—66%).

b) Reduktion von Valeraldehydammoniak^{1,2}. Ansatz wie a). Man läßt 36 g Valeraldehyd, gelöst in 400 ccm n-Ammoniak, zutropfen. Im übrigen wie zuvor. Erstes wäßriges Destillat mit Schwefelsäure angesäuert und nochmals destilliert. Weitere Reinigung wie vorher. Ausbeute etwa 80—84% an Amylalkohol.

c) Reduktion von Chloralhydrat zu Trichloräthanol³. Eine Lösung von 600 g Zucker und 120 g Dinatriumphosphat in 5 l Wasser mit 600 g abgepreßter Bierhefe zur Gärung gebracht, sodann 40 g Chloralhydrat in 500 ccm Wasser während $\frac{3}{4}$ Stunden unter kräftigem Rühren eintropfen gelassen. Nach 4 Tagen bei Zimmertemperatur kommt die Gärung zum Stillstand. Prüfung auf Chloralhydrat: 10 ccm Flüssigkeit + 2 ccm verdünnter Natronlauge mit Wasserdampf destilliert; Destillat mit einigen Tropfen Resorcinlösung auf 50° erwärmt, mit 2 ccm Natronlauge versetzt: Rotfärbung (Probe von SCHWARZ).

Aufarbeitung: Hefe abzentrifugiert (oder abgesaugt), Filtrat mit Kieselgur geklärt, ausgesalzen, erschöpfend ausgeäthert, Ätherextrakt getrocknet, Äther entfernt. Rückstand im Vakuum destilliert.

Charakterisierung des Trichloräthanols mittels des p-Nitrobenzoylchlorids: Die wäßrige Lösung des Trichloräthanols wird mit p-Nitrobenzoylchlorid versetzt und die Reaktion durch vorsichtigen Zusatz von 10%iger Natronlauge alkalisch gehalten. Aufarbeitung in üblicher Weise. Fp. 71°.

Anhang: Theoretisches.

Reduktion von Aldehydgruppen findet in allen bisher untersuchten Fällen statt, falls die betreffende Substanz nicht allzu giftig ist. Die Ausbeuten sind allerdings, je nach der Art des Aldehyds recht verschieden (vgl. unten). Prinzipiell gleich den Aldehyden verhalten sich

¹ Vgl. NEUBERG und GORR, in OPPENHEIMER und PINCUSSEN, Methodik der Fermente, S. 1212. Leipzig: Thieme, 1929.

² Die Anwendung des Aldehydammoniaks ist nicht nur zur Erhöhung der Ausbeute vorteilhaft, sondern auch stets dann zu empfehlen, wenn empfindliche, leicht verharzende Aldehyde der Reduktion unterworfen werden; auf diese Weise war z. B. auch die Reduktion des Phenylacetaldehyds zu Phenyläthylalkohol möglich [vgl. NEUBERG und WELDE: Biochem. Z. 62, 477 (1914)].

³ Nach WILLSTÄTTER und DUISBURG: B. 56, 2283 (1923).

die α -Ketosäuren, indem sie zunächst decarboxyliert werden. Hydrierung wurde bisher bei folgenden Aldehyden beobachtet (Ausbeuten an Reduktionsprodukten in Klammer):

Einfache aliphatische gesättigte Aldehyde: Formaldehyd (15%), Isobutyraldehyd (25%), n-Valeraldehyd (70%), Isovaleraldehyd [auch durch B. coli und B. lactis aerogenes (73%)], Methyläthylaldehyd (zu l-Amylalkohol, 16%), n-Hexylaldehyd, n-Heptylaldehyd (50%).

Aliphatische ungesättigte Aldehyde: Crotonaldehyd (zu Butylalkohol neben etwas Crotylalkohol, 19%), Sorbinaldehyd (Sorbinalkohol neben Hexenol, 44%), Octatrienal (Octatrienol, daneben Octadienol, 68%), Citronellal (zu Citronellol, 50%), Citral (zu Geraniol, 30%).

Aliphatische Oxyaldehyde: Glykolaldehyd (zu Äthylenglykol, 30%), Acetaldehyd (zu 1,3-Butylenglykol, 63%), d,l-Milchsäurealdehyd (zu d-Propylenglykol).

Halogenierte aliphatische Aldehyde: Chloralhydrat (zu Trichloräthylalkohol, 70%), Tribromacetaldehyd (Tribromäthylalkohol, „Avertin“, 30%, daneben auch etwas Dibromäthanol), 2,2,3-Trichlorbutyraldehyd (zu Trichlorbutanol).

Thioaldehyde (Anwendung in Form des geschwefelten Aldehydammoniaks, des Thialdins): Umwandlung in Mercaptane. Auch die Hydrierung der Disulfidgruppe zur Mercaptogruppe hat sich bewerkstelligen lassen (beim Äthylendisulfid).

Heterocyclische Aldehyde: Furfuraldehyd (zu Furfuralkohol, 70%).

Einfache aromatische Aldehyde: Benzaldehyd (zu Benzylalkohol, 32% in Gegenwart von CaCO_3), Phenylacetaldehyd (zu Phenyläthylalkohol, etwa 30%, in Gegenwart von Ammoniak).

Ungesättigte aromatische Aldehyde: Zimtaldehyd (Zimtalkohol oder Hydrozimtalkohol 17%), Benzylidencrotonaldehyd (wird sehr schlecht vertragen).

Aromatische Oxyaldehyde: Salicylaldehyd (zu Saligenin, in Gegenwart von CaCO_3), Tetracetyl-gluco-coniferylaldehyd (zum zugehörigen Alkohol).

Aromatische Nitroaldehyde: o-Nitrobenzaldehyd (zu o-Nitrobenylalkohol, in geringer Menge).

Aliphatische α -Ketosäuren: Sorbinylidenbrenztraubensäure (bei kurzer Versuchsdauer zu Octatrienol, 85%, bei längerer Versuchsdauer zu Octadienol, 60%).

18. Übung:

Hydrierung von Ketonen.

a) **Demonstrationsversuch: Hydrierung von 1, 4, 9, 10-Anthradichinon¹.** 50 g Rohrzucker in 300 ccm Wasser, 25 g abgepreßte Oberhefe. Nach Eintritt lebhafter Gärung erfolgt tropfenweiser

¹ VERCELLONE: Bioch. Z. 279, 137 (1935). — Einen einfachen Indikator für die reduzierenden Wirkungen der Hefe bildet auch das Oxyhämoglobin, das durch eine Hefesuspension rasch reduziert wird, wie spektroskopisch leicht nachweisbar ist. Vgl. NEUMANN: Bio. Z. 281, 181 (1935).

Zusatz von 0,8 g Anthradichinon¹ in 8 ccm Dioxan; in wenigen Augenblicken wird das farblose Gärgut rot, Verstärkung der Färbung beim weiteren Zusatz. Unter häufigem Umschütteln 2 Stunden bei Raumtemperatur gären lassen (Gäraufsatz). Kontrollprobe: Gemisch wie oben, aber mit Invertzucker (oder auch Glucose) 10 Minuten auf 90° erwärmt (Hefe abgetötet) und dann wie oben weiter behandelt; es findet erst nach längerer Zeit Verfärbung statt².

Aufarbeitung: Zentrifugieren der Gäransätze, Rückstände mit frisch geglühtem Natriumsulfat verrieben, pulverige Masse im Soxhlet mit Aceton extrahiert; Lösung verdunstet, Rückstand in kaltem Eisessig gelöst, filtriert, im Meßkolben auf 100 ccm aufgefüllt. Bestimmung des Chinizarins: Eine Probe (5—10 ccm) mit der dreifachen Menge Wasser versetzt; Niederschlag nach fünf Minuten auf einer Sinterglasnutsche (G 4) abgesaugt; nach dem vollkommenen Auswaschen der Essigsäure wird bei 100° getrocknet und gewogen (bei längerem Stehen der Eisessiglösung findet Selbstzersetzung und Erhöhung der Chinizarinmenge statt).

b) Reduktion von Acetophenon zu Methylphenylcarbinol³. 41 10%iger Rohrzuckerlösung werden mit 400 g abgepreßter Bierhefe zur Gärung gebracht, 20 g Keton innerhalb 4 Stunden zutropfen gelassen. Kräftig rühren. Gärung während weiterer 10 Tage unter täglichem Zusatz von noch 400 g Zucker und 400 g Hefe fortgeführt.

Aufarbeitung. Wasserdampfdestillat einige Male mit Äther ausgeschüttelt; Auszüge vereinigt, mit Wasser gewaschen. Ätherische Lösung wiederholt mit konzentrierter Na-Bisulfitlösung auf der Maschine ausgeschüttelt, sodann mit 10%iger Sodalösung gewaschen, über frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet, Hauptmenge des Äthers abdestilliert. Rückstand zur Entfernung der letzten Reste des unveränderten Ketons mit Phenylhydrazin behandelt: Gemisch nach mehrstündigem Stehen mit Wasserdampf destilliert; Übertreibung des Reduktionsproduktes (neben dem überschüssigen Phenylhydrazin und Resten des Äthers). Destillat mit Schwefelsäure versetzt (Bindung des Phenylhydrazins) und erschöpfend ausgeäthert. Extrakt vom Äther befreit und destilliert. Methylphenylcarbinol geht bei 202—204° über.

¹ Darstellung durch Oxydation von 1,4-Dioxyanthrachinon mit Bleitetraacetat nach DIMROTH, FRIEDEMANN und KÄMMERER: B. 53, 484 (1920).

² Selbstzersetzung des Anthradichinons unter Bildung von Chinizarin und Oxydation eines zweiten Anteils zu Phthalsäure.

³ Vgl. NEUBERG und GORR, in OPPENHEIMER und PINCUSSEN: Methodik der Fermente, S. 1212, Leipzig: Thieme 1929.

c) **Reduktion von Benzil zu Benzoin**¹. Ansatz wie zuvor, aber in 6 l; Zutropfen von 30 g Benzil in 550 ccm 75%igem Alkohol unter kräftigem Rühren (bei 40°). Gärung sodann bei Zimmertemperatur unter Rühren weiterführen; nach etwa 4 Tagen noch die gleiche Menge Zucker und Hefe zufügen und Gärung bei 37° beenden lassen. An Stelle des tiefgelben Benzils erscheint in der Maische allmählich ein nahezu farbloser Niederschlag.

Aufarbeitung: Gärgut aufkochen (wobei sich die Substanz zum größten Teil löst) und durch einen Heißwassertrichter oder im Dampftopf filtrieren. Aus dem etwas eingengten Filtrat scheiden sich feine Nadeln aus; absaugen, auf Ton trocknen, 16 g. Fp. 134—135° nach wiederholtem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol. Die Substanz reduziert FEHLINGSche Lösung in der Kälte. Hauptmenge optisch inaktiv. Eine kleine Menge aus der Mutterlauge ist linksdrehend. Aubeute 53% d. Th.

Anhang: Theoretisches.

Die Reduktion der einfachen Ketone zu sekundären Alkoholen erfolgt nur sehr schwer, die Ausbeute überschreitet kaum 10%; neben den Reduktionsprodukten sind stets erhebliche Mengen der unveränderten Ketone vorhanden. Bemerkenswert ist, daß dabei optisch aktive Alkohole entstehen (in der Regel die l-Formen); die Wasserstoffanlagerung erfolgt also assymmetrisch.

Die Reduktion der Diketone geht wesentlich leichter vor sich, wobei entweder beide Ketogruppen reduziert werden (z. B. Diacetyl \longrightarrow Butylenglykol) oder nur eine (Dibenzyl \longrightarrow Benzoin); sehr glatt und vollständig lassen sich Chinone zu Hydrochinonen reduzieren (z. B. Xylochinon \longrightarrow Xylohydrochinon in 100%iger Ausbeute). Die Hydrierung wurde bisher bei folgenden Ketonen beobachtet:

Einfache aliphatische Ketone: Methyläthylketon (zu sekundärem Butylalkohol, etwa 10%), Methyl-n-propylketon (zu Methyl-n-propylcarbinol, etwa 10%), Methyl-n-hexylketon (zu Methyl-n-hexylcarbinol, etwa 10%), Methyl-n-nonylketon (zu Methyl-n-nonylcarbinol).

Ungesättigte aliphatische Ketone: Methylheptenon (zu Methylheptenol, etwa 10%).

Oxyketone: Acetol (zu l-Propylenglykol), Dioxyaceton (zu Glycerin, 19%) Acetoin (zu l-2,3-Butylenglykol).

Halogenierte Ketone: Methyl- α -Chloräthylketon (zu aktivem 2-Chlor-3-Oxybutan), α , α -Dichloraceton (zu aktivem α , α -Dichlor-isopropylalkohol).

Einfache fett-aromatische Ketone: Acetophenon (zu l-Methylphenylcarbinol).

Ketonaldehyde: Methylglyoxal (zu l-Propylenglykol, 5%), Acetessigaldehyd (zu l,3-Butylenglykol).

Diketone: Diacetyl (zu l-2,3-Butylenglykol, 35%), Benzil (zu Benzoin, 53%).

¹ Vgl. NEUBERG und GORR, in OPPENHEIMER und PINCUSSEN: Methodik der Fermente, S. 1212, Leipzig: Thieme 1929.

Chinone: p-Xylochinon (zu p-Xylohydrochinon), durch gärende Hefe (etwa 90%) sowie durch *B. coli* und *Aerobacter aerogenes* (100%).

Von besonderem Interesse sind die biochemischen Reduktionen in der Gruppe der Sexualhormone¹ und Gallensäuren². Damit wird die präparative Bedeutung der Hefehydrierungen erneut unter Beweis gestellt.

19. Übung.

Hydrierung von ungesättigten Verbindungen und Nitrokörpern.

a) **Reduktion von Zimtaldehyd zu Hydrozimtalkohol**³. 5 l Zucker-Phosphatlösung (enthaltend 350 g Zucker und 250 g primäres Na-Phosphat) + 2,5 l Hefebrei (pro Liter etwa 50 g Trockensubstanz, gewaschen durch viermaliges Dekantieren und Absitzenlassen). Eintropfen von 20 g frisch destilliertem Zimtaldehyd (in 80 ccm 75%igem Alkohol) während 2 Stunden. Später noch 150 g Zucker und zweimal je 800 ccm Hefebrei zugesetzt.

Aufarbeitung: Wasserdampfdestillat mit Äther extrahiert, denselben abdestilliert, Rückstand in wenig Äther wieder aufgenommen (zurück bleibt eine farblose Gallerte) und Extrakt destilliert. $K_{p_{12}}$ 116—120°, 3,5 g (17%) Phenylpropylalkohol (der noch etwas Zimtalkohol enthält). Identifizierung durch Oxydation mit Permanganat zu Hydrozimtsäure.

Die Hydrierung von Doppelbindungen durch gärende Hefe findet nach F. G. FISCHER⁴ nur dann statt, wenn die Doppelbindung in α , β -Stellung zur funktionellen Gruppe steht; diese kann dabei eine Aldehydgruppe, Ketogruppe oder primäre Carbinolgruppe sein⁵. So bleibt z. B. Methylheptenol unverändert (Doppelbindung in β , γ -Stellung). Bei mehrfach ungesättigten Verbindungen (z. B. Sorbinalkohol oder Sorbinaldehyd) wird gleichfalls nur die benachbarte Doppelbindung hydriert. Die Hydrierung von Doppelbindungen wurde bisher bei folgenden Körpern beobachtet:

¹ MAMOLI: B. 71, 2278, 2696, 2701 (1938). — MAMOLI und G. SCHRAMM: B. 71, 2698 (1938). — VERCELLONE und MAMOLI: B. 70, 470, 2079 (1937). — MAMOLI: H. 248, 277 (1937). — MAMOLI und VERCELLONE: H. 245, 93 (1937).

² CH. H. KIM: Enzymologia 4, 119 (1937).

³ F. G. FISCHER und WIEDEMANN: A. 513, 260 (1934); 520, 52 (1935); 522, 1 (1936).

⁴ F. G. FISCHER und WIEDEMANN: A. 513, 260 (1934); 520, 52 (1935); 522, 1 (1936). Auch Enzympräparate erwiesen sich als wirksam. F. G. FISCHER und H. EYSENACH: A. 529, 87 (1937).

⁵ Bei Carboxylverbindungen liegen besondere Verhältnisse vor. Nach F. G. FISCHER [Ang. Ch. 49, 559 (1936)] werden α , β -ungesättigte Monocarbonsäuren nicht hydriert. Hinsichtlich einer neuartigen enzymchemischen Hydrierung der Fumarsäure vgl. F. G. FISCHER und EYSENACH: A. 530, 99 (1937).

Ungesättigte Alkohole: Sorbinalkohol (zu Hexenol), Crotylalkohol (zu Butanol, 55%)¹, Zimtalkohol (zu Hydrozimtalkohol, etwa 70%).

Ungesättigte Aldehyde: Crotonaldehyd (Butylalkohol, 19% unter gleichzeitiger Reduktion der Aldehydgruppe), Sorbinaldehyd [Hexen(4)-ol(1), daneben wenig Hexen(3)ol(1), samt Sorbinalkohol 44%], Octatrienal (Octadienol).

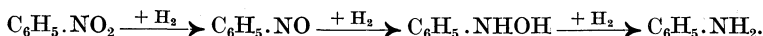
Ungesättigte α -Ketosauren: Sorbinylidenebrenztraubensäure (Octadienol, 60%), Benzylidenebrenztraubensäure (Phenylpropanol, 75%); Cinnamylidenebrenztraubensäure (wird kaum angegriffen, schädigt stark).

Ungesättigte Ketone (die Hydrierung der Doppelbindung geht dabei vor der Reduktion des Carbonyls vor sich): Crotonylideneacetone (gibt das zugehörige Heptenon, bei langer Gärdauer auch ein Heptenol), Cinnamalacetone (gibt das betreffende Phenylhexenon).

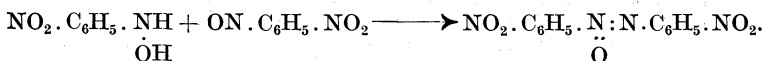
b) Reduktion von Nitrobenzol zu Anilin. 500 g Zucker in 5 l Wasser mit 500 g Hefe zur lebhaften Gärung gebracht, sodann 10 ccm frisch destilliertes Nitrobenzol eintropfen gelassen, Rührwerk. 3 Tage bei Zimmertemperatur, 2 Tage im Brutschrank.

Aufarbeitung: Gärgut mit Kalilauge alkalisch gemacht (Phenolphthalein), Dampfdestillat (1,25 l) mit Schwefelsäure kongosauer gemacht, unverändertes Nitrobenzol sowie Alkohol mit Wasserdampf übergetrieben (bis zum völligen Verschwinden des Nitrobenzolgeruches). Destillationsrückstand alkalisch gemacht und weiter mit Wasserdampf behandelt. Dieses Destillat nun mit Schwefelsäure angesäuert und zur Entfernung von Verunreinigungen mit Äther ausgeschüttelt, wäßriger Anteil sodann wieder alkalisch gemacht und das Anilin erschöpfend ausgeäthert. Extrakt über Pottasche getrocknet, Äther abdestilliert, Rückstand fraktioniert, destilliert. Kp. 181—184°, 3,8 g reines Anilin, Charakterisierung in üblicher Weise. Ausbeute 39% d. Th.

Die Reduktion des Nitrobenzols verläuft wohl über Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin, denn auch diese Körper lassen sich durch gärende Hefe zu Anilin reduzieren; Reaktionsverlauf daher:



Von Interesse ist ferner das Verhalten des m-Dinitrobenzols, da bei dessen Reduktion durch gärende Hefe außer dem als Hauptprodukt auftretenden m-Nitranilin als Nebenprodukt das m-Dinitroazoxybenzol gebildet wird, wohl aus dem betreffenden Hydroxylaminkörper und Nitroskörper durch Kondensation entstanden:



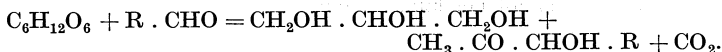
¹ Auch gärende Colibakterien bewirken diese Reduktion. F. G. FISCHER und W. ROBERTSON: A. 529, 84 (1937).

Anhang: Zum Chemismus der Acyloinsynthesen und Hydrierungen bei der Hefegärung.

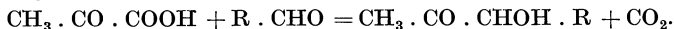
a) Die **Acyloinsynthesen** in gärenden Zuckerlösungen bei Zusatz von Aldehyden führen unter Beteiligung des aus der Vergärung des Zuckers stammenden naszenten Acetaldehyds zu gemischten Acyloinen. Die Reaktion konnte vor allem in der aromatischen Reihe verwirklicht werden (vgl. oben), während in der aliphatischen Reihe bisher nur im Falle des Acetaldehyds ein Acyloin erhalten wurde. Ferner entsteht Acetoin auch bei der Brenztraubensäuregärung bei Zusatz von Acetaldehyd. In ähnlicher Weise könnten vielleicht auch symmetrische Acyloine aus anderen α -Ketosäuren und den zugehörigen Aldehyden gewonnen werden; es bleibt eine Aufgabe weiterer Untersuchungen festzustellen, wieweit diese Reaktion durch Anwendung auf andere derartige Systeme präparativ nutzbar gemacht werden kann.

Es ist demnach für den Eintritt der Acyloinkondensation 1 Mol. stabilisierter Aldehyd (Aldehydhydrat) und 1 Mol. naszenter Aldehyd (durch CO_2 -Abspaltung entstehend) erforderlich und weiterhin nach NEUBERG ein, Carboligase genanntes Enzym. Dagegen soll nach DIRSCHERL¹ die Acyloinsynthese allein mit der Carboxylasewirkung zusammenhängen. Dagegen sprechen allerdings die Unterschiede im Verhalten des carboligatischen und carboxylatischen Wirkungsfaktors gegenüber äußeren Einflüssen; gegen die rein chemische Bildungsweise der Acyloine unter Beteiligung des naszenten Acetaldehyds spricht auch die optische Aktivität der erzeugten Acyloine (NEUBERG). Die spezifische Drehung des Acetoin ist bei den einzelnen Organismen verschieden², und beträgt bei Bierhefe oder Macerationssaft -40 , bei *Bac. lactis aerogenes* -66 , bei *Bac. mesentericus fuscus* -78 , *Bac. nasso* -98 . — Die Frage nach der Bildungsweise der Acyloine erscheint jedenfalls noch nicht endgültig entschieden³. Die Fähigkeit zur Bildung von Acetoin (bzw. 2, 3-Butylenglycol) kommt jedenfalls sehr vielen Organismen wie auch der höheren pflanzlichen und tierischen Zelle zu⁴.

Verlauf der Acyloinsynthese in gärender Zuckerlösung: Der Umsatz erfolgt in analoger Weise wie bei der zweiten, dritten und vierten Vergärungsform, indem der bei der Zuckerspaltung entstehende Acetaldehyd durch die Acyloinbildung gewissermaßen abgefangen, und so der weiteren Umsetzung entzogen wird; als Reduktionsäquivalent tritt daher auch hier Glycerin auf⁵:



In Gegenwart von Brenztraubensäure ist der Reaktionsverlauf:



¹ DIRSCHERL: H. 188, 225 (1930).

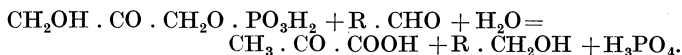
² TOMIYASU: Bio. Z. 292, 234 (1934).

³ Vgl. dazu auch TOMIYASU: Bio. Z. 289, 97 (1936) sowie DIRSCHERL und SCHÖLLIG H. 252, 70 (1938).

⁴ Literatur vgl. bei TOMIYASU: Enzymologica 3, 263 (1937).

⁵ ELION: Biochem. Z. 169, 471 (1926).

b) Die **Hydrierungen** in gärenden Zuckerlösungen erstrecken sich vor allem auf die Aldehyd- und Ketogruppe, auf Doppelbindungen und Nitrogruppen. Bei der Hydrierung von Aldehyden und Ketonen tritt als Nebenprodukt stets Acetaldehyd auf, der dem Zucker entstammt. Dies deutet darauf hin, daß der sonst für die Hydrierung des Acetaldehyds verwendete Wasserstoff zur phytochemischen Reduktion der Aldehyd- bzw. Ketogruppe der zugesetzten Substanz verwendet wird. Bei diesen Hydrierungen dürfte daher folgende Oxydoreduktionsreaktion stattfinden:



Es wird daher der gemäß der rein formellen Gleichung



entstehende „Gärungswasserstoff“ auf die zugesetzten Wasserstoffacceptoren übertragen, wobei sich demnach als Äquivalent Acetaldehyd anhäufen muß. Dagegen scheinen bei der Hydrierung von Doppelbindungen besondere Verhältnisse vorzuwalten, denn dabei konnte kein Acetaldehyd aufgefunden werden. (F. G. FISCHER.) Sehr bemerkenswert ist, daß sich Hydrierungen von Doppelbindungen auch mit Fermentlösungen aus Hefe durchführen lassen, doch ist dazu die Anwesenheit von „gelbem Ferment“ (WARBURG) erforderlich; die hydrierte Stufe desselben wirkt dabei als H_2 -Überträger. Das Flavinzym wird durch Bestandteile des übrigen Dehydrogenasensystems hydriert. Carbonylgruppen werden unter diesen Bedingungen nicht reduziert¹.

Die *präparative Bedeutung der biochemischen Hydrierungen* besteht vor allem darin, daß auf diesem Wege gewisse leicht zersetzliche oder veränderliche Substanzen reduziert werden können (z. B. Tetracetylgluco-coniferylaldehyd zum betreffenden Alkohol, oder halogenierte Aldehyde und Ketone zu den zugehörigen Alkoholen ohne Eliminierung des Halogens, also im Gegensatz zu den rein chemischen Verfahren). Weiterhin verläuft die biochemische Hydrierung asymmetrisch, also unter Bildung optisch aktiver Produkte (z. B. sekundärer Alkohole aus Ketonen usw.). Schließlich ermöglicht dieselbe auch eine stufenweise Reaktion, indem vielfach nur bestimmte Gruppen sofort angegriffen werden und andere erst später (z. B. Überführung von Benzil in Benzoin, Reduktion von Sorbinyldenbrenztraubensäure zunächst zu Octatrienol bei kurzer Versuchsdauer und zu Octadienol bei langer Versuchsdauer usw.).

¹ F. G. FISCHER: Ang. Ch. 49, 559 (1936).

II. Anoxydative Bakteriengärungen.

A. Die Milchsäure- und Propionsäuregärung.

20. Übung:

Isolierung, Züchtung und Untersuchung der Bakterien.

a) **Isolierung von *Lactobac. Delbrückii* aus Getreidemaische und Reinzüchtung desselben.** Je 5 g Getreideschrot (Weizen, Gerste) oder Grünmalz verschiedener Herkunft werden in Kolben mit je 100 ccm Wasser oder steriler Würze übergossen und 24 Stunden bei 48—50° stehen gelassen. Eine Trübung der Flüssigkeit und die Säuerung derselben (Titrationsprobe an je 10 ccm mittels n/10 Lauge) deutet auf die Anwesenheit von *Lactobac. Delbrückii* hin. (Wenn sich an der Oberfläche eine weißgraue trockene Haut gebildet hat, so ist der Heubacillus vorhanden und die betreffenden Proben sind zu verwerfen.) Nach weiteren 24 Stunden wird wieder titriert und dann von der Probe mit dem höchsten Säurewert in einige Ansätze mit steriler Maische oder Würze eingepfht. Die Säurebildung wird durch Titration kontrolliert und diese Übertragung des öfteren wiederholt, um die Kultur von allenfalls vorhandenen Heubacillen zu befreien (diese vermögen zwar in gesäuerten Flüssigkeiten nicht zu wachsen, doch bleiben deren Sporen erhalten).

Die Reinzüchtung wird in PETRI-Schalenkulturen in Getreidemaische-agar oder Würzeagar vorgenommen. Bildung von Kolonien bei 40—45° nach 24 Stunden; dieselben sind $\frac{1}{2}$ —1 mm groß, rundlich, flach, wasserhell oder weißlich und glänzend. Mikroskopische Untersuchung. Prüfung des Wachstums in Tröpfchenkulturen (Würze oder Maische) Fortzüchtung in Maische, ungehopfter Würze, Malzkeimabkochung oder Hefewasser mit Zucker, gegebenenfalls unter Zusatz von Calciumcarbonat.

Wenn das Bacterium durch Hitze, Säure oder Alter gelitten hat, so wächst es auf Agar nicht an. Es ist dann eine Übertragung einer kleinen Menge der betreffenden sauren Maische in sterile süße Maische oder Würze erforderlich (eventuell mit CaCO_3). Nach 24 Stunden bei 40—45° findet hierauf in der Regel wieder Wachstum statt.

b) **Gewinnung von Milchsäurebakterien und anderen Organismen aus Milch.** a) Je 50 ccm frische Milch werden in kleinen ERLÉNMEYER-Kölbchen (mit Watte verschlossen) bei 50, 40 und 30° 24 Stunden lang stehen gelassen. Die Milch ist dann überall geronnen und wird mikroskopisch untersucht:

Bei 50° entwickelt sich *Lactobac. lactis*: lange, unbewegliche Zellen.

Bei 40°: *Lactobac. lactis*, ferner Streptokokken (in Ketten angeordnete kugelige Zellen) und *Bact. lactis acidii* (kleine, meist zu zwei oder vier zusammenhängende, kurz-eiförmige Zellen).

Bei 30°: Fast nur *Bact. lactis acidii* (das bei dieser Temperatur die übrigen Organismen unterdrückt).

β) 50 ccm frische Milch werden in einem Kölbchen mit Watteverschluß 10 Minuten lang in einem siedenden Wasserbad erhitzt. 24 Stunden bei 40° aufbewahrt. Die Probe ist nun grünlich gefärbt, nicht geronnen (das Eiweiß ist peptonisiert), die mikroskopische Untersuchung ergibt Heubacillenarten (stark bewegliche, lange Zellen). Die nicht sporenbildenden Milchsäurebakterien werden durch das Erhitzen abgetötet.

γ) Eine Flasche von 50 ccm Inhalt wird mit frischer Milch möglichst voll gefüllt, 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, noch heiß mit einem Kork fest verschlossen und bei 40° stehen gelassen. Nach 24 Stunden ist starker Buttersäuregeruch wahrnehmbar, die mikroskopische Untersuchung ergibt unbewegliche Buttersäurebakterien, die unter den anaeroben Bedingungen zur Entwicklung gelangen.

c) **Untersuchung von Joghurtpräparaten.** Die Präparate werden zunächst der „Joghurtbereitungsprobe“ unterworfen: Einbringen einer Probe in abgekochte Milch bei 40—54° und Stehenlassen bei über 40°¹. Nach einigen Stunden kann die bakteriologische Untersuchung vorgenommen werden. Man findet meist körnchenfreie (stark säuernde) und körnchenhaltige (schwächer säuernde) Langstäbchen (*Lactobac. bulgaricus*), ferner *Streptococcus thermophilus* (meist lange, vier bis zehngliedrige Ketten) und häufig das *Bact. lactis acidii*. Die Trennung der Bakterien gelingt besonders durch Züchtungen bei verschiedenen Temperaturen².

21. Übung.

Herstellung von Impfkulturen und Bakterienpräparaten.

a) **Herstellung von Impfkulturen** für die Durchführung präparativer Gärversuche. Z. B. *Lactobac. Delbrückii*, in drei Stufen,

¹ Bei der Herstellung von Joghurt im Haushalt geht man so vor, daß die auf $\frac{2}{3}$ eingekochte Milch bei 45° mit einer Reinkultur oder mit etwas fertigem Joghurt versetzt wird. Nach sorgfältigem Umschütteln wird das Gefäß mit Tüchern gut umgeben, damit es sich möglichst langsam abkühlt; nach 3—4 Stunden ist der Joghurt fertig (eine dicke, schwach saure, aromatisch schmeckende Milch, die allerlei Darmstörungen zu beheben vermag).

² Vgl. HENNEBERG, Hdb. d. Gärungsbakteriologie Bd. 2, S. 142.

und zwar: 1. Eine Reinkultur des *Lactobac. Delbrückii* wird in 10 ccm steriler Malzwürze (ungehopfte Bierwürze) von 8—10° Bllg. eingepfht, nach 24 Stunden bei 42—45° Trübung der Flüssigkeit, mikroskopische Prüfung der Reinheit der Kultur. 2. Zusatz der ganzen Kultur zu 100 ccm steriler Malzwürze (wie zuvor), die noch 10 g Rohrzucker oder Glucose und 15 g CaCO_3 (Schlämmeckreide) enthält (Kolben mit Gäraufsatz), 3—4 Tage bei 48—49°. 3. Die gärende Maische von 2. wird in zwei Kolben mit je 500 ccm steriler Würze-Rohrzuckerlösung (Zusammensetzung wie zuvor) mit CaCO_3 eingepfht. Nach 3—4 Tagen Verwendung dieser Kulturen für die Impfung präparativer Gärversuche (vgl. Übung 22b und c).

b) Herstellung von Massenkulturen der Bakterien¹. Z. B. Propionsäurebakterien. Züchtung in einer klaren Lösung, enthaltend 20 g Pepton, 10 g Na-lactat und 1,5 g KH_2PO_4 in 1000 ccm Leitungswasser (p_{H} 6,8). 4 Tage bei 35°. Zentrifugieren, Bakterienmasse in Wasser suspendieren und wieder zentrifugieren, auf porösen Tontellern in sehr dünner Schicht trocknen. Ausbeute an Trockenpräparat etwa 30 g pro 100 l Nährlösung. Bakterienzählung in der feuchten Bakterienmasse.

c) Herstellung von Alkohol-Äther-Trockenpräparaten der Bakterien. Frisch abgeschleuderte Bakterienmasse in Portionen von etwa 50 g in ein Gemenge von 600 ccm absolutem Alkohol und 200 ccm absolutem Äther eingetragen, 8 Minuten gut verührt, abgesaugt, mehrmals mit trockenem Äther nachgewaschen, in einem Porzellanmörser verrieben, im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd nebst Paraffin getrocknet. In einer Glasstöpselflasche aufbewahrt; viele Enzyme bleiben in den Präparaten monatelang haltbar.

22. Übung.

Die Milchsäuregärung.

a) Analytischer Gärversuch unter quantitativer Verfolgung des Gärverlaufes. In einem 300 ccm-Kolben 200 ccm Lösung, enthaltend 5% Glucose, 0,5% Pepton, 0,2% KH_2PO_4 , 0,05% MgSO_4 , 0,01% NaCl; nach dem Sterilisieren mit 20 ccm einer Würzekultur des *Lactobac. Delbrückii* (vgl. Übung 21a, zweite Stufe) geimpft. Gärverschluß aufgesetzt (mit Hg gefüllt, um Verdunstung einzuschränken). Nach 24 Stunden 3 g CaCO_3 zugesetzt, 6—8 Tage bei

¹ VIRTANEN: Soc. Scient. Fenn. 2, 20 (1925). — Vgl. ferner: NEUBERG und SCHEUER: M. 53/54, 1031 (1929) — Bact. Zählung in der Bakterienmasse vgl. VIRTANEN: H. 134, 300 (1924); 138, 136 (1924); 143, 71 (1925).

43—45°. Entnahme von je 15 ccm Probe nach etwa 6—8 Stunden (Gärungsbeginn) und sodann noch etwa sechs- bis achtmal in Intervallen von je 24 Stunden, bis zum Aufhören der Gärung. Die jeweils entnommene Probe wird sofort in ein trockenes Kölbchen filtriert. Analytische Bestimmungen im Filtrat:

Glucosegehalt. Feststellung der Glucose-Abnahme vom Beginn der Gärung bis zum Aufhören derselben; zunächst an 1 ccm Probe und dann ansteigend bis 5 ccm. Nach der Zuckerbestimmungsmethode von BERTRAND: Erforderliche Lösungen: I. 40 g krystallisiertes Kupfersulfat in 1 l Wasser gelöst. II. 200 g Seignettesalz und 150 g Ätznatron in Wasser gelöst, auf 1 l aufgefüllt. III. 50 g Ferrisulfat in 200 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure gelöst, auf 1 l verdünnt (Lösung muß frei von reduzierenden Stoffen sein, Prüfung mit Kaliumpermanganatlösung). IV. n/10-Kaliumpermanganatlösung. Probe mit 20 ccm Lösung I und II versetzt, genau 3 Minuten im gelinden Sieden erhalten (Sanduhr). Cu_2O absitzen lassen (Schrägstellen des ERLÉNMEYER-Kolbens). Überstehende Flüssigkeit (noch blau gefärbt) möglichst vorsichtig abdekantiert (unter Benutzung eines Asbestfiltrerröhrchens, in das aber nach Möglichkeit kein Niederschlag gelangen soll), mit heißem Wasser durch vorsichtiges Dekantieren zwei- bis dreimal ausgewaschen. Niederschlag (samt eventuell im Asbestfiltrerröhrchen befindlichen Anteilen) in einer ausreichenden Menge der Lösung III (15—25 ccm) gelöst und mit Lösung IV titriert. Farbumschlag sehr deutlich. 1 ccm n/10- $\text{KMnO}_4 = 6,36$ mg Cu. Ermittlung der äquivalenten Glucosemenge mit Hilfe einer empirischen Tabelle oder Kurvenabbildung (vgl. Anhang II, 1a).

Calciumgehalt. Zunächst an etwa 10 ccm, später an 5 ccm, in üblicher Weise: Fällung der siedenden Lösung mit heißer Ammonoxalatlösung, Filtrieren nach dem Absitzen, Auswachen, Lösen in etwa 20%iger Schwefelsäure und Titrieren mit n/10- KMnO_4 -Lösung. 1 ccm = 2,004 mg Ca = 9,005 mg Milchsäure. Wiedergabe der gefundenen Glucose- und Milchsäurewerte in Form von Kurven.

Qualitativer Nachweis der Milchsäure. 1 ccm der vergorenen, filtrierten Maische mit etwas verdünnter Permanganatlösung versetzt und aus einem kleinen Kölbchen destilliert. Destillat auf Acetaldehyd geprüft (nach RIMINI, vgl. S. 118).

Quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Überführung derselben in Acetaldehyd durch Oxydation mit KMnO_4 . Ausgegorene Maische filtriert und auf ein bestimmtes Volumen auf-

gefüllt. 20 ccm Probe werden entnommen, enteiweißt und entzuckert und sodann die Milchsäurebestimmung durchgeführt¹.

b) Präparativer Versuch I: Milchsäuregewinnung aus Stärke. Herstellung der Maische durch Verzuckerung von Kartoffelstärke mittels Malz: In einen emaillierten Blechtopf von 10 l Inhalt wird 1 kg Kartoffelmehl (mit etwa 75% Stärkegehalt) in ungefähr 5 l Wasser unter gutem Rühren eingetragen, innerhalb $\frac{1}{2}$ —1 Stunde auf 70—75° zwecks Verflüssigung des Stärkekleisters erwärmt, auf 56° abgekühlt und 60 g Malzschrot² eingetragen, 4—5 Stunden erwärmt (allmählich bis 60°), Proben zur Feststellung der Verzuckerung entnommen (Prüfung auf Stärke und Dextrine mit Jodlösung), schließlich Temperatur auf 80° gesteigert, sodann das ganze auf ein Volumen von etwa 7 l gebracht, auf 50° abgekühlt, in das Gärgefäß eingefüllt (unten tubulierte, mit Ablaufhahn und Rührwerk versehene 10 l-Flasche, vgl. Abb. 9, S. 73), 400 g sterile Kreide und 500 ccm einer Bierwürzekultur des *Lactobac. Delbrückii* (vgl. Übung 21 a, 3. Stufe) zugesetzt. Etwa 12 Tage bei 45—46°, unter zeitweisem Aufrühren des CaCO_3 . Probeentnahme und Prüfung mit FEHLINGScher Lösung.

Gewinnung des Ca-Lactates: Vergorene Maische nach Zusatz von etwas Kalkmilch bis zur schwach alkalischen Reaktion in einem Topf aufgeköcht und filtriert, ausgewaschen, im Vakuum auf etwa $\frac{1}{3}$ verdampft. Krystallisation von Ca-Lactat beim Erkalten (eventuell Animpfen), nach 1—2 Tagen im Eisschrank abgeseugt, abgepreßt, mit wenig Eiswasser angeteigt und nochmals abgepreßt. Man erhält Ca-Lactat mit drei Mol Krystallwasser. Aus der Mutterlauge in analoger Weise eine weitere Menge gewinnbar.

c) Präparativer Gärversuch II: Milchsäuregewinnung aus Rohrzucker nach dem Zulaufverfahren. Apparatur wie bei b), aber mit Tropftrichter versehen. Maische: 1 l Bierwürze, 4 l 10%ige Rohrzuckerlösung und etwa 50 g Malzschrot (oder Kleie usw. als Trägermaterial für die Ansiedlung der Bakterien³, nach dem Sterilisieren eingefüllt, mit 750 g Schlämmkreide und 500 ccm einer Bierwürzekultur des *Lactobac. Delbrückii* (vgl. Übung 21a)

¹ Hinsichtlich aller Einzelheiten der Methodik sei auf BERTHO-GRASSMANN: Biochemisches Praktikum. Berlin: Walter de Gruyter 1936, S. 246 ff. verwiesen. Ein neuer Apparat zur Milchsäurebestimmung wurde von FUCHS [H. 221, 271 (1933)] beschrieben.

² Dieses enthält auch die für Milchsäurebakterien besonders wichtigen löslichen Eiweißstoffe und Phosphate. Eventuell wird noch Superphosphat und Ammonsulfat zugesetzt.

³ Blanke Gärmaischen sind zu vermeiden, da sich die Bakterien absetzen und Wachstum und Säurebildung schwächer sind.

versetzt, bei 45° vergären lassen, etwa alle 4—5 Stunden einige Minuten gut durchrühren. Vom 5.—15. Tag an täglich 200 ccm einer 50%igen Rohrzuckerlösung zusetzen (insgesamt noch etwa 1 kg Rohrzucker); sodann Gärung ohne weiteren Zusatz beenden lassen (insgesamt etwa 20 Tage). Probe auf Zucker.

Aufarbeitung: Vergorene Maische wie in b) weiter behandelt. Krystallisation des Ca-Lactates ohne Verdampfung.

Darstellung der freien Milchsäure. Ca-Lactat unter Zusatz von Tierkohle aus möglichst wenig heißem Wasser umkrystallisiert; das aus dem Filtrat wie oben gewonnene Produkt nach dem Abpressen mit der äquivalenten Menge 50%iger Schwefelsäure umgesetzt. Gips abgesaugt, ausgewaschen, Filtrat im Vakuum so weit eingedampft, daß eine etwa 70%ige „technisch reine“ Milchsäure entsteht. Reinigung derselben: Extraktion der 70%igen Milchsäure in einem kontinuierlichen Apparat mit Äther, ätherische Lösung mittels Tierkohle völlig entfärbt. Äther abdestilliert. Man erhält eine etwa 90%ige, reine Milchsäure.

Anhang I: Technologie der Milchsäuregärung.

Ausgangsmaterialien: In Deutschland gewöhnlich Kartoffelstärke, seltener Mais- oder Reisstärke und Rohrzucker; in Italien: Molken, Zuckerrübensaft, Melasse; in USA. Zuckerrohrmelasse, Reisstärke, Glucose.

Technische Bakterien: Ganz überwiegend *Lactobac. Delbrückii*, manchmal auch *Bact. lactis acidi* Leichmann (vergärt auch Milchsücker). Infektionsgefahr durch gleichfalls wärmestabile Bakterien, besonders Essigsäure- und Buttersäurebildner (dabei kommt es zunächst zu trägen, dann sehr stürmischen Gärungen). Herstellung der Bakterienkulturen in großen Reinzuchtapparaten.

Herstellung der Maische: Verzuckerung der Stärke mittels Malz, direkt in den Gärbottichen in üblicher Weise (für 1333 kg Kartoffelmehl mit 75 % Stärkegehalt 80 kg Grünmalz oder Malzschrot). Zusatz von Schlämmeide (50 % der Stärke). Die Maische enthält 10—11 % Maltose (oder Glucose).

Gärverlauf: Zusatz der Impfmaische aus dem Reinzuchtapparat. Nach 6—8 Stunden Eintritt der Gärung; alle 2 Stunden wird die Kreide aufgerührt. Nach 8—10 Tagen bei 49° ist die Gärung beendet.

Gewinnung der technischen Milchsäure: Zusatz von Kalkmilch, Aufkochen, Absitzen lassen, Abziehen der klaren Lösung, Abpressen in Filterpressen. Im Vakuum auf 28—30° Bé verdampfen, dann mit einem Gemisch von 50%iger Milchsäure und Schwefelsäure versetzt, Gipsbrei abfiltriert, Lösung ergibt die 50%ige technische Milchsäure des Handels.

Gewinnung von Genußmilchsäure (chemisch-reine Milchsäure) aus dem gereinigten Ca-Salz nach dem Umsetzen desselben mit Schwefelsäure durch Ätherextraktion.

Optische Aktivität der Milchsäure. Die technisch verwendeten Organismen erzeugen in der Regel inaktive Milchsäure¹, manchmal zeigt dieselbe aber auch schwache Drehung. Es wurden aber auch Milchsäurebakterien in Reinkultur gewonnen, die entweder nur die l- oder die d-Form, oder inaktive Säure produzieren². — Die technische Erzeugung der d-Säure, die aus ernährungsphysiologischen Gründen wichtiger ist³, läßt sich unter Verwendung geeigneter Organismen ohne Schwierigkeiten bewerkstelligen⁴. Hinsichtlich der Erzeugung von d-Milchsäure durch Pilze vgl. Nachtrag. Von Interesse ist ferner die Racemisierung von d- oder l-Milchsäure durch ein in Butylbakterien vorkommendes Fermentsystem⁵. — Siehe auch Nachtrag.

Hinsichtlich verschiedener Faktoren der Milchsäuregärung⁶, der Aktivität der Organismen⁷, der Vergärung hochkonzentrierter Zuckergelösungen⁸ vgl. die Originalliteratur.

Schließlich sei auch noch darauf hingewiesen, daß nach SCHRADER⁹ durch den technischen Maischebacillus (*Lactobac. Delbrückii*) stets auch wechselnde Mengen von Essigsäure und Ameisensäure gebildet werden. Diese Frage bedarf aber wohl noch einer eingehenderen Prüfung.

Anhang II: Grünfuttersilierung.

Bei allen biologischen Verfahren zur Grünfuttereinsäuerung wird eine möglichst reine Milchsäuregärung angestrebt. Die dabei auftretende freie Milchsäure (bis etwa 2%) wirkt konservierend (besonders für das pflanzliche Eiweiß). Um ein Überwiegen der Milchsäurebakterien zu erreichen, müssen bestimmte Bedingungen genau eingehalten werden. Von Bedeutung wurde vor allem das Kaltgärverfahren:

Ausgangsmaterialien: Klee, Bohnen, Rübenblätter, Lucerne, Futterrüben, Kartoffeln usw.

Organismen: Bei niederen Temperaturen (8–20°) *Bact. lactis acidii*, bei mittleren Temperaturen (20–35°) *Lactobac. cucumeris*, bei höheren Temperaturen (35–55°) *Lactobac. Delbrückii*. — Die anderen Organismen (heterofermentative Milchsäurebakterien, butylogene Bakterien u. v. a.) sind unerwünscht, aber nicht völlig ausschaltbar.

Durchführung des Prozesses: Das möglichst saubere Material wird gehäckselt (da rascher Saftaustritt erforderlich ist), in die wasser-

¹ PEDERSON, PETERSON und FRED: J. biol. Chem. **68**, 160 (1926). — SCHRADER: C. Bact. II, **84**, 1 (1931).

² TATUM, PETERSON und FRED: Bioch. J. **26**, 846 (1932).

³ Im tierischen Körper kann nur diese verwertet werden.

— ⁴ TATUM und PETERSON: Ind. Eng. Chem. **27**, 1493 (1935).

⁵ TATUM, PETERSON und FRED: Bioch. J. **30**, 1892 (1936).

⁶ RAHN, HEGARTY u. DENEL: J. Bact. **35**, 547 (1938). — RAHN u. HEGARTY: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 218 (1938). — H. G. WOOD, A. A. ANDERSON u. C. H. WERKMAN: ebenda **36**, 217 (1937). Über den Einfluß von Pantothensäure und Nikotinsäure auf Milchsäurebakterien vgl. SNELL, STRONG u. PETERSON: Bioch. J. **31**, 1789 (1937); Am. Soc. **60**, 2825 (1938). Hinsichtlich der wachstumsfördernden Wirkung von Flavinen vgl. SNELL und STRONG: J. biol. Chem. **123**, Sc. Proc. 112 (1938).

⁷ K. J. RUDAKOW: Bl. USSR. Inst. agr. Mikrobiol. **8**, 123 (1936).

⁸ WURSTER: Molkereiztg. **1937**, 2190.

⁹ SCHRADER: C. Bact. II **84**, 1 (1931).

dichten Silobehälter eingefüllt, und zwecks Verdrängung der Luft möglichst fest gelagert (mit Hilfe von Trettieren). Eventueller Zusatz von Viehsalz (bis 0,2%, zwecks Beschleunigung des Saftaustrittes) sowie von Zucker (besonders bei eiweißreichen Pflanzen; bis 0,5% in Form von Melasse, Rohzucker oder Holzzucker) und eventuell von Mineralsäuren, um einen geeigneten pH-Wert einzustellen. Luftdichter Abschluß des Silos durch einen schweren Deckel oder eine Lehmschicht. — Entscheidend für das Gelingen ist eine sofort einsetzende kräftige Milchsäuregärung.

Beurteilung des Silofutters auf Grund des Verhältnisses von Milchsäure zu Essigsäure zu Buttersäure; und zwar bei Klasse I etwa $\frac{2}{3}:\frac{1}{3}:\text{O}$ oder $\frac{3}{4}:\frac{1}{4}:\text{O}$, Klasse II etwa 1:1:O, Klasse III: etwas Buttersäure vorhanden, Klasse IV: viel bis überwiegend Buttersäure, Klasse V: ungeeignet (jauchig).

23. Übung.

Die heterofermentative Milchsäuregärung.

a) Die Vergärung von Glucose¹ (Essigsäure-Glycerin-Gärung neben Milchsäure-Äthanol-Gärung). Nährlösung: 20 g Glucose gelöst in 100 ccm Wasser, 6 g K_2HPO_4 und 6 g KH_2PO_4 gelöst in 400 ccm Wasser sowie 500 ccm Hefewasser² (1:10; vgl. S. 34), in dem noch 10 g Pepton gelöst sind, werden getrennt sterilisiert (20 Minuten im Autoklav), dann vereinigt (pH 6,2) und mit 25 ccm einer 3 Tage alten Kultur von *Lactobacillus lycopersici* oder *Lactobacillus manni-topoeus* u. a. im gleichen Medium geimpft. Die Gärung wird unter dauerndem Durchleiten eines sauerstofffreien Stickstoffstromes etwa 3 Wochen bei 30° durchgeführt. In Intervallen von einigen Tagen werden 2—5 ccm Probe zur Bestimmung des Zuckergehaltes entnommen.

Bestimmung des Zuckergehaltes nach LEHMANN-MAQUENNE-SCHOORL (ohne Enteiweißung)³: Das CuO wird in der gleichen Weise wie bei der BERTRANDSchen Methode abgeschieden (vgl. S. 160), nur muß die Kupfersulfatlösung genau einpipettiert werden. Nach dem Erkalten setzt man, ohne zu filtrieren, 10 ccm einer 30%igen Kaliumjodidlösung und 10 ccm 25%ige Schwefelsäure zu. Das durch das überschüssige Kupfersulfat ausgeschiedene Jod wird sofort in üblicher Weise mit n/10-Thiosulfatlösung

¹ Vgl. NELSON und WERKMAN: J. Bacter. 30, 547 (1935).

² Oder 3 g Hefeextrakt (Difco) in 500 ccm Wasser.

³ Da in Gegenwart von Eiweiß das CuO zum Teil in Lösung gehalten wird, müßte bei allen Methoden, bei denen die Zuckermenge durch direkte Bestimmung des CuO ermittelt wird, das Eiweiß zunächst entfernt werden. Dagegen ist die obige Methode auch zur Zuckerbestimmung in eiweißhaltigen Lösungen geeignet, da sie vom abgeschiedenen CuO unabhängig ist und das in Lösung befindliche CuII bestimmt.

titriert. Unter gleichen Bedingungen führt man einen Leerversuch (ohne Zucker) durch. Aus der Differenz beider Titrationsen berechnet man den Zuckergehalt in genau gleicher Weise wie bei der BERTRANDSchen Methode. 1 ccm $n/10 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 6,36 \text{ mg Cu}$.

Bestimmung des CO_2 : Erfolgt in einem an das Ableitungsrohr des Kolbens angeschlossenen Kaliapparat (gravimetrisch); zur Bestimmung des noch in Lösung befindlichen CO_2 wird ein aliquoter Teil des Mediums angesäuert und unter Rückflußkühlung erhitzt; durch einen die Flüssigkeit durchstreichenden Strom von CO_2 -freier Luft wird die Kohlensäure ausgetrieben und in einen Kaliapparat zwecks gravimetrischer Bestimmung übergeführt.

Bestimmung der flüchtigen Säuren (Essigsäure). 100 ccm des Mediums werden mit Wasserdampf destilliert und das Wasserdampfdestillat (etwa 500 ccm) titriert.

Bestimmung der Milchsäure: Extraktion von 100 ccm der Nährlösung mit Äther; weitere Bestimmung in einem aliquoten Teil des Extraktes wie oben. Auch die Bestimmung des *Äthanol*s erfolgt in der gleichen Weise wie früher angegeben (vgl. S. 112).

Bestimmung des Glycerins: 200 ccm des Mediums werden mit NaOH alkalisch gemacht und auf 10—15 ccm verdampft; der Rückstand mit frisch geglühtem Natriumsulfat behandelt und das so erhaltene trockene Pulver mit Äther erschöpfend extrahiert (etwa 3 Tage). Nach dem Entfernen des Äthers wird an aliquoten Teilen das Glycerin nach WAGENAARS Methode¹ oder nach ZEISEL-FANTO-STRITAR (vgl. S. 120) bestimmt.

b) Die Vergärung der Fructose (Essigsäure-Mannit-Gärung neben Milchsäure-Äthanol-Gärung)². 500 ccm einer 6%igen Fructoselösung und 500 ccm einer Nährlösung, bestehend aus Hefeautolysat 1:5 (oder 1,2% Difco), 0,1% NaH_2PO_4 und 0,3% Na_2HPO_4 werden getrennt sterilisiert (wie unter a), dann vereinigt und wie oben geimpft. Nach dem Verschließen mit einem Gäraufsatz läßt man bei etwa 34° ausgären (10—14 Tage). Eine raschere Vergärung wird durch Anwendung von Bakterienmassen erreicht³. — Die Bestimmung der Essigsäure, Milchsäure und Fructose erfolgt in gleicher Weise wie bei Versuch a).

*Bestimmung des Mannits*⁴: 100 ccm der vergorenen Lösung, die keine Fructose mehr enthalten soll⁵, werden enteiweißt (durch

¹ WAGENAAR: Pharm. Weekblad 48, 497 (1911).

² Nach Versuchen von J. JAKOWATZ: Diss., Prag 1938.

³ BOLCATO: Ann. Chim. Appl. 23, 405 (1933).

⁴ Nach SMIT: Z. anal. Chem. 53, 473 (1914).

⁵ Falls noch Fructose vorhanden ist, wird dieselbe mittels Hefe vergoren.

Zusatz von 5 ccm Eisessig und 25 ccm einer 0,5 molaren Bleiacetatlösung, filtrieren über Kieselgur, Entfernen des Bleies mittels H_2S und nochmalige Filtration), die Milchsäure wird durch Extraktion mit Äther entfernt (der Ätherextrakt kann zur Bestimmung der Milchsäure verwendet werden), dann wird die Lösung auf ein bestimmtes Volumen gebracht und 50 ccm in einen 100 ccm-Maßzylinder mit eingeschliffenem Stöpsel eingefüllt. 25 ccm 4 n-NaOH und 25 ccm Kupfersulfat (125 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ im Liter) zugesetzt. Nach kräftigem Umschütteln läßt man 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Von der überstehenden klaren Flüssigkeit werden 25 ccm herauspipettiert und 10 ccm 30%ige KJ-Lösung sowie 10 ccm 25%ige H_2SO_4 zugesetzt. Das frei gesetzte Jod wird mittels n/10 Na-Thiosulfat titriert¹. Die Mannitmenge ergibt sich auf Grund einer empirischen Tabelle (XVI).

Tabelle XVI.

a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
0,25	—	4	142,8	11	378,1	18	596,9	25	822,6
0,5	8,3	5	176,7	12	410,8	19	628,1	26	855,6
1,0	27,4	6	210,0	13	441,6	20	659,7	27	888,6
1,5	47,8	7	243,3	14	472,4	21	691,9	28	930,9
2,0	68,0	8	277,0	15	503,1	22	724,1	29	992,4
2,5	88,0	9	310,7	16	534,4	23	756,6	29,1	1000,0
3,0	107,1	10	344,4	17	565,6	24	789,6		

a = ccm n/10 Thiosulfat pro 25 ccm Mischung.

b = mg Mannit in 100 ccm Mischung.

*Isolierung des Mannits*². 500 ccm der vergorenen Lösung im Vakuum zur Sirupkonsistenz eingeeengt; die Masse zur Entfernung organischer Säuren usw. wiederholt mit Äther extrahiert. Der zurückbleibende Sirup mit der gleichen Menge Alkohol versetzt, wobei sich aus dem Hefewasser stammende Verunreinigungen ausscheiden. Filtrat mit der 2—3fachen Menge

¹ Die Bestimmung des Mannits erfolgt grundsätzlich in derselben Weise wie die Glycerinbestimmung nach WAGENAAR. Prinzip: Mehrwertige Alkohole hemmen die Fällung des Kupferhydroxyds in alkalischer Lösung. Es bleibt also eine dem vorhandenen Mannit entsprechende Menge Kupferhydroxyd in Lösung, durch die dann eine äquivalente Menge Jod frei gesetzt wird.

² Vgl. BOLCATO: Ann. Chim. Appl. **23**, 405 (1933). — Vgl. ferner YAMASAKI und SIMOMURA: Bio. Z. **291**, 340 (1937); Bildung von Mannit aus Glycerin durch Schimmelpilze.

Alkohol versetzt, beginnt rasch zu krystallisieren. Nach dem Stehen im Eiskasten abgeseigt, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. — Aus dem Filtrat kann man nach nochmaligem Abdampfen bis zur Sirupkonsistenz und Zusatz der 3—4fachen Menge Alkohol noch einen Anteil erhalten. Gesamtabscheidung fast quantitativ. Aus wenig Wasser umkrystallisiert (dicke rhombische Prismen) oder aus Alkohol (seidenglänzende Nadeln); Schmelzpunkt 166°.

Identifizierung des Mannits: Darstellung der Tribenzalverbindung¹. Schmelzpunkt 213—217°.

24. Übung:

Gewinnung und Umwandlung von Zwischenprodukten der Milchsäuregärung.

a) Bildung von Methylglyoxal². 1000 ccm 4%iger Mg-Hexosediphosphatlösung (wie in Übung 12 a, S. 134), 10 g Trockenbakterien (Herstellung vgl. Übung 21 c, S. 159) (z. B. *Aerobacter aerogenes*) und 10 ccm Toluol, ebenso Vergleichsversuch (100 ccm des gleichen Ansatzes aber ohne Bakterien), in einer verschlossenen Flasche (oder Kolben) 48 Stunden bei 37° belassen. Sodann Zusatz von etwa 2—3 g Fullererde, zentrifugieren, eventuell noch filtrieren. Klares Filtrat auf 1000 ccm auffüllen und zur Prüfung auf Methylglyoxal verwenden.

Methylglyoxal-bis-2,4-dinitrophenylhydrazon. Gewinnung aus 20—50 ccm (als Vorprobe) wie in Übung 9 a.

*Methylglyoxim (Methylglyoxaldioxim) und dessen Nickelsatz*³. 400 ccm des Filtrates, ohne Enteiweißung mit 5 g festem neutralem Hydroxylaminsulfat versetzt und 1 Tag im Thermostaten stehen gelassen, dann mit Natriumsulfat gesättigt und erschöpfend mit Äther extrahiert (eventuell unter Zusatz von etwas Alkohol zur Beseitigung von Emulsionen). Ätherauszüge vereinigt, mit frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet, unter gleichzeitiger Zugabe von Calciumcarbonat (zur Entsäuerung); filtriert, Lösungsmittel entfernt, Rückstand im Exsiccator über Phosphorpentoxyd belassen, wobei Krystallisation stattfindet. Aus möglichst wenig

¹ FISCHER und FAY: B. 28, 1979 (1895). — PETTE: B. 64, 1567 (1931).

² Vgl. NEUBERG und KOBEL: Bioch. Z. 207, 232 (1929). — FROMAGEOT: Bioch. Z. 216, 467 (1929). — NEUBERG u. SCHEUER: M. 53/54, 1031 (1929); B. 63, 3068 (1930).

³ Vgl. NEUBERG und SCHEUER: M. 53/54, 1031 (1929); weitere Möglichkeit zur Isolierung des Methylglyoxals als 3-Methyl-Naphthopyrazin vgl. NEUBERG und SCHEUER: B. 63, 3068 (1930).

heißem Wasser (unter Zusatz von Tierkohle) umkristallisiert. Schmelzpunkt 157° . Aus der nach dem Umkristallisieren verbleibenden Mutterlauge kann noch das Nickelsalz gewonnen werden $[\text{Ni}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{N}_2)_2]$: Zusatz von Nickelacetat (m-Nickelsalzlösung + 3 m-Natriumacetat). Bildung eines rotvioletten Niederschlages, der beim Erwärmen auf dem Wasserbad gelbrot wird, infolge des Überganges der Substanz in eine stabilere isomere Modifikation.

b) **Dismutation des Methylglyoxals.** 100 ccm Bakteriensuspension (*Lactobac. Delbrückii*, mit etwa 2,5 g Trockensubstanz, vgl. Übung 21b, S. 159). 10 ccm molare Methylglyoxallösung (0,72 g) und 890 ccm Wasser, nach Zusatz von 5 g CaCO_3 in einer verschlossenen Flasche bei 37° stehen gelassen (Kontrollversuch analog, aber ohne Methylglyoxal). Probeentnahme nach der 4. Stunde: je 10 ccm filtriert, mit Trichloressigsäure enteiweißt und mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin geprüft (wie in Übung 9a). Aufarbeitung, sobald keine Fällung mehr eintritt (nach etwa 5–10 Stunden). Flüssigkeit aufgeköcht und nach Zusatz von etwas Fullererde filtriert oder zentrifugiert. Bestimmung des Ca-Gehaltes in 50 ccm Probe in üblicher Weise und des Milchsäuregehaltes in 20 ccm Probe gemäß Übung 22a.

*Isolierung von Zinklactat*¹. 800 ccm Filtrat im Verdunstungskasten oder im Vakuum zur Trockne verdampft. Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, mit Phosphorsäure gegen Kongo schwach angesäuert, auf dem Wasserbad zum Sirup eingengt, mit frisch geglühtem Natriumsulfat in einer Reibschale zu einem feinen mehlartigen Pulver verrieben. Gemisch sofort (da hygroskopisch) in die Papierhülle eines SOXHLET-Apparates eingefüllt (mit einem passenden Filter bedeckt und oberer Rand der Hülle umgeschlagen) und erschöpfend mit Äther extrahiert (etwa 10 Stunden). Äther abdestilliert, Rückstand in Wasser aufgenommen, mit einem Überschuß von wasserfreiem Bleicarbonat mehrere Stunden am Wasserbad erhitzt, dann mit Eis gekühlt, filtriert, mit eiskaltem Wasser nachgewaschen, Lösung mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert, Luftstrom durchgeleitet, Flüssigkeit mit alkalifreiem Zinkoxyd bis zur neutralen Reaktion am siedenden Wasserbad erhitzt, filtriert, mit heißem Wasser nachgewaschen, Filtrat am Wasserbad eingengt; meist findet schon in der Wärme Krystallisation statt (inaktives Zinklactat)². Beim Erkalten

¹ NEUBERG und KOBEL: Biochem. Z. 182, 470 (1927).

² Beim aktiven Salz ist Einengen bis zum dünnen Sirup erforderlich, der erst beim Abkühlen und Reiben mit einem Glasstab zu einem dicken Krystallbrei erstarrt.

Krystallbrei; abgesaugt, mit einigen Tropfen Eiswasser nachgewaschen, auf Ton getrocknet, einmal aus wenig Wasser umkrystallisiert.

c) **Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure**¹. 26 g glycerinmonophosphorsaures Barium (vgl. Übung 14, S. 138) werden unter Zugabe von 60 ccm 50%iger Essigsäure mit Wasser auf ein Volumen von 360 ccm gebracht und bis zur Lösung geschüttelt; eine geringe Trübung beseitigt man durch Zentrifugieren. 345 ccm des Zentrifugates mit 141 ccm 10%iger Natriumsulfatlösung, 36,4 ccm 33%iger Natronlauge und 52,6 ccm Wasser versetzt (Gesamtvolumen 575 ccm), kräftig umgeschüttelt und zentrifugiert. Die so erhaltene Natriumsalzlösung hat den p_H -Wert 6,6 (Gehalt an phosphoglycerinsaurem Natrium $C_3H_5O_7PNa_2 = 2,72\%$).

230 ccm dieser Lösung werden mit 23 g der frisch gezüchteten, abzentrifugierten, noch feuchten Bakterienmasse (*Lactobac. Delbrückii*, vgl. S. 159) und 10 ccm Toluol versetzt. (Vergleichsversuch: 50 ccm Wasser, 5 g Bakterienmasse, 2 ccm Toluol.) Entnahme von Proben zu Beginn, nach 2, 3 und 4 Tagen bei etwa 37°. Bestimmung des Gehaltes an anorganischem Phosphat (kolorimetrisch) und an Brenztraubensäure (durch Fällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, vgl. S. 136), nach dem Enteiweißen mit Trichloressigsäure (vgl. S. 130). Identifizierung der Brenztraubensäure durch Fällung eines aliquoten größeren Teiles beim Versuchsabbruch mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Reinigung des Hydrazons durch Abtrennen eines sodaunlöslichen Anteils (Acetaldehyd-2,4-Dinitrophenylhydrazon vom Schmelzpunkt 165° nach dem Umkrystallisieren) und Umfällen (vgl. S. 136), schließlich aus Essigester umkrystallisieren. Schmelzpunkt 220—222°.

Anhang I: Typen der Milchsäuregärung.

Unterscheidung von zwei Typen², je nachdem ob nur Milchsäure oder auch andere Gärprodukte entstehen: Homofermentative und heterofermentative Milchsäuregärung³.

a) **Homofermentative Milchsäuregärung**. Erreger: z. B. *Lactobac. Delbrückii*, *Lactobac. bulgaricus*, *Streptococcus lactis*⁴. Zerlegung des Zuckers zu 95% und darüber gemäß der Gärungsgleichung:

$$C_6H_{12}O_6 = 2 CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH.$$

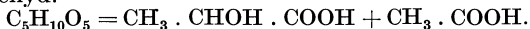
¹ Vgl. NEUBER und KOBEL: *Biochem. Z.* **260**, 241 (1933).

² S. ORLA-JENSEN, *The Lactic acid Bacteria*, K. Danske Videnskab. Selskab. Skrifter, Naturvidenskab. Math. A'fde. Series 8, 5, 81, Kopenhagen 1919.

³ KLUYVER und DONKER: *Proc. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* **28**, 297 (1924).

⁴ Von Interesse ist ferner, daß auch Organismen, die normalerweise keine Milchsäuregärung verursachen, unter besonderen Be-

Pentosenvergärung durch homofermentative Milchsäurebakterien z. B. Xylose durch *Lactobacillus pentosus*: Bildung äquimolekularer Mengen Milchsäure und Essigsäure¹, wohl über Glycerinaldehyd und Glykolaldehyd.



b) **Heterofermentative Milchsäuregärung.** Erreger: *Lactobacillus fermentatus*, *Lactobacillus pentoaceticus*, *Lactobacillus lycopersici*, *Lactobacillus manni*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus aerogenes*, *Lactobacillus gracilis*, *Lactobacillus fructivorans* u. a. Grundsätzlich verschiedener Gärverlauf, je nachdem, ob Glucose oder Fructose vergoren wird.

a) *Vergärung von Glucose*: Gemischte Milchsäure-Äthanol-Gärung neben der charakteristischen Essigsäure-Glycerin-Gärung. Es finden also dabei zugleich grundsätzlich drei Gärungsvorgänge statt, und zwar:

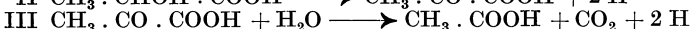
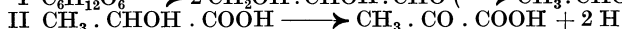
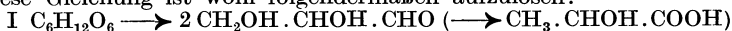
1. Normale Milchsäuregärung,

2. Äthanolgärung,

3. Essigsäure-Glycerin-Gärung², gemäß der Gärungsgleichung:

$$3 C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \longrightarrow 2 CH_3 \cdot COOH + 2 CO_2 + 4 CH_2OH \cdot CHO \cdot CH_2OH.$$

Diese Gleichung ist wohl folgendermaßen aufzulösen:



IV $CH_2OH \cdot CHO \cdot CHO + 2 H \longrightarrow CH_2OH \cdot CHO \cdot CH_2OH.$
 Falls das Reduktionsprodukt Glycerin nicht in einer der Gärungsgleichung äquivalenten Menge auftritt, wird es zur Entwicklung von

dingungen dazu veranlaßt werden können; Umschaltungen anderer Gärungen in Milchsäuregärung:

a) Umschaltung der alkoholischen Hefegärung in Milchsäuregärung (E. AUHAGEN und NEUBERG: *Biochem. Z.* **264**, 452, 1933; E. und T. AUHAGEN: *Biochem. Z.* **268**, 247, 1934), indem durch bestimmte Maßnahmen die Glykolase weniger als die anderen Enzyme gehemmt wird; es bildet sich also zunächst Methylglyoxal und aus diesem die Milchsäure unter der Einwirkung der durch Glutathion aktivierten Ketonaldehyd-Mutase. Dies bildet zugleich eine Stütze für die Anschauung, daß Methylglyoxal auch bei der Hefegärung entstehen muß (vgl. S. 16 und 135).

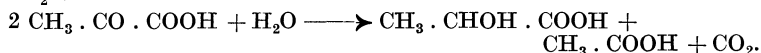
b) Umschaltung der Coligärung in reine Milchsäuregärung (CATTANEO und NEUBERG: *Biochem. Z.* **272**, 441, 1934) durch Einwirkung von Massenkulturen (insbesondere von Trockenpräparaten) auf Hexosediphosphat in Gegenwart von Toluol und Glutathion. Dabei wurde fast 100%ige Bildung von Milchsäure beobachtet.

c) Umschaltung der Buttersäuregärung in Milchsäuregärung (KUBOWITZ: *Biochem. Z.* **264**, 285, 1935). In Gegenwart von CO werden die zur Buttersäure führenden sowie die sonstigen Vorgänge gehemmt, und es kommt nur zur Bildung von Milchsäure, wohl aus dem primär entstehenden Methylglyoxal.

¹ FRED, PETERSON und Mitarbeiter: *J. of biol. Chem.* **39**, 347 (1919); **53**, 111 (1922).

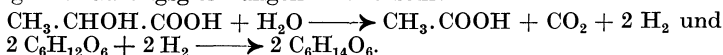
² NELSON und WERKMAN: *J. Bacter.* **30**, 547 (1935). — Vgl. dazu auch KLUYVER: *J. Soc. Chem. Ind.* **52**, 373 (1933) und *Erg. d. Enzymforsch.* **4**, 246 (1935).

H₂ kommen. Die Vergärung von Brenztraubensäure allein führt zur Bildung von Milchsäure als Reduktionsprodukt neben Essigsäure und CO₂¹:



Das Mengenverhältnis der Gärprodukte ist bei dieser Gärungsform sehr schwankend und von den äußeren Bedingungen sowie der Art der Gärungserreger in hohem Maße abhängig; zumeist überwiegt dabei die Milchsäure-Äthanol-Gärung (z. B. bei *Lactobacillus fermentatus*²), vielfach geht aber auch die Essigsäure-Glycerin-Gärung in recht erheblichem Ausmaße vor sich³.

β) *Vergärung von Fructose*. Milchsäure-Äthanolgärung neben der charakteristischen Essigsäure-Mannitgärung. Der typische Prozeß ist die Reduktion der Fructose durch den bei der Essigsäurebildung auftretenden naszenten Wasserstoff. Theoretisch müßten folgende Gärungsgleichungen erfüllt sein:



In Wirklichkeit wurden jedoch auf 3 Mol. vergorener Fructose. 2 Mol. Mannit, 2 Mol. Essigsäure und 2 Mol. CO₂ beobachtet⁴. Nebenbei entsteht auch etwas Alkohol und Milchsäure. Das Mengenverhältnis der Gärprodukte hängt stark von der Art der Gärungserreger ab⁵. In einem Fall wurden bis gegen 60% der Fructose zu Mannit reduziert, unter Bildung der entsprechenden Menge Essigsäure und CO₂, neben wenig Milchsäure und sehr wenig Äthanol⁶. Das Fermentsystem der Essigsäure-Mannitgärung ist von dem der Milchsäuregärung völlig unabhängig⁷. Diese Gärung wird auch zur technischen Gewinnung von Mannit verwendet (z. B. in Italien)⁸.

Anhang II: Chemismus der reinen Milchsäuregärung.

a) **Milchsäurebildung über Methylglyoxal als Zwischenprodukt.** Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure unter der Einwirkung der Ketonaldehydmutase (NEUBERG, DAKIN), die nicht nur in Milchsäurebakterien vorkommt, sondern in fast allen Zellen und Geweben.

¹ NELSON und WERKMAN: Jowa State Coll. Journ. of Sc. **10**, Nr 2, 141 (1936).

² SMIT: Diss. Amsterdam 1913.

³ NELSON und WERKMAN: J. Bacter. **30**, 547 (1935). — FRED, PETERSON und Mitarbeiter: J. of biol. Chem. **41**, 431 (1920); **42**, 175, 273 (1920); **48**, 385 (1921); **64**, 643 (1925).

⁴ BOLCATO: Ann. di Chim. appl. **23**, 405 (1933).

⁵ Vgl. auch CHARLETON, NELSON und WERKMAN: Jowa State Coll. Journ. Sci. **9**, 1 (1934).

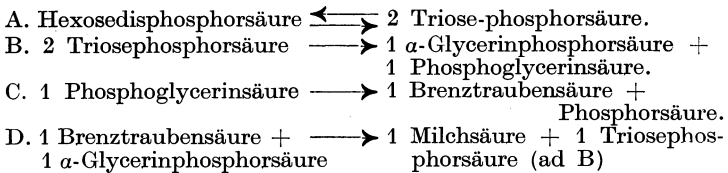
⁶ PEDERSON: Bull. New York State agr. Exp. Stat., Techn. Bull. 151 (1929).

⁷ BOLCATO: Enzymologia **5**, 52 (1938).

⁸ Auch die eingemieteten Rüben unterliegen nach VONDRAK (C. **1933**, II 630, 3210) einer Mannitgärung, wobei dann das Futter über 5% Mannit (bezogen auf Trockensubstanz) enthielt. — Beim Liegen von Topinamburknollen unter Wasser setzt spontane Mannitgärung ein (SCHLUBACH und KNOOP: A. **497**, 208, 1932).

Bildung von Methylglyoxal aus Hexosediphosphorsäure (nicht nur durch Milchsäurebakterien wie *Lactobac. Delbrückii*¹, sondern auch durch zahlreiche andere Organismen, sowie Zell- und Gewebextrakte). Einleitende Reaktion: Phosphorylierung, z. B. bei *Lactobac. helveticum* (= *Bact. casei* ϵ)²; Bildung von ROBISON-Ester³. Enzymatische Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure mittels der Ketonaldehydmutase nur in Gegenwart eines Co-Fermentes (Glutathion)⁴.

b) Milchsäurebildung über Brenztraubensäure als Zwischenprodukt, nach folgendem Schema (EMBDEN-MEYERHOF):



Reaktionen A, B und C wie bei der alkoholischen Gärung (vgl. S.142). Charakteristisch für die Milchsäurebildung ist Reaktion D, also die Oxydoreduktion zwischen Brenztraubensäure und Glycerinphosphorsäure, wogegen bei der alkoholischen Gärung die Glycerinphosphorsäure nicht weiter in Reaktion treten kann.

Abfangung von Brenztraubensäure bei der anaeroben Milchsäurebildung des Muskels besonders in Gegenwart von Sulfid⁵, als Reduktionsprodukt findet sich die äquivalente Menge α -Glycerinphosphorsäure⁶. Abfangung von Brenztraubensäure bei der durch *Laetobac. caucasicus* bewirkten Milchsäuregärung mittels Semikarbazid⁷; wurde allerdings bestritten⁸ bzw. auf eine Dehydrierung von primär entstandener Milchsäure zurückgeführt⁹. Ferner erscheint von Wichtigkeit, daß in Gegenwart von Sulfid die Milchsäuregärung völlig normal verläuft, und weder Brenztraubensäure noch eine andere Carbonylverbindung abfangbar ist¹⁰. Andererseits geht aber die Milchsäurebildung auch in Abwesenheit des Co-Fermentes der Ketonaldehydmutase vor sich, kann also dann nicht über Methylglyoxal verlaufen.

Die Frage, ob also die Milchsäurebildung über Methylglyoxal oder über Brenztraubensäure verläuft, läßt sich vorläufig noch nicht mit Sicherheit entscheiden, vielleicht gehen auch beide Reaktionen nebeneinander vor sich, ohne daß sich bisher sagen

¹ NEUBERG und KOBEL: *Biochem. Z.* **207**, 232 (1929).

² VIRTANEN: *H.* **138**, 136 (1924); **143**, 71 (1925).

³ VIRTANEN und TIKKA: *Biochem. Z.* **228**, 417 (1930).

⁴ LOHMANN: *Biochem. Z.* **254**, 332 (1932).

⁵ CASE: *Biochemic. J.* **26**, 753, 759 (1932).

⁶ MEYERHOF und KIESSLING: *Biochem. Z.* **264**, 40 (1933).

⁷ KOSTYTSCHEW und Mitarbeiter: *H.* **168**, 124 (1927); **188**, 127 (1930).

⁸ NEUBERG und KOBEL: *Biochem. Z.* **191**, 472 (1927); **199**, 230 (1928).

⁹ Vgl. SIMON: *Biochem. Z.* **245**, 388 (1932).

¹⁰ VIRTANEN, KARSTRÖM und BÄCK: *H.* **151**, 232 (1926).

läßt, unter welchen Bedingungen die eine und unter welchen die andere überwiegt. Jedenfalls verfügen sowohl Milchsäurebakterien wie der Muskel über die Enzymapparate zur Durchführung beider Reaktionsfolgen.

25. Übung:

Die Propionsäuregärung.

a) **Auswahl geeigneter Bakterien.** Eine größere Anzahl von ERLÉNMEYER-Kolben wird mit je 200 ccm folgenden Mediums beschickt: 3% Glucose, 0,2% K_2HPO_4 , 0,5% NaCl in Hefewasser (1:10)¹. Nach dem Sterilisieren Zusatz von 2% trocken sterilisiertem $CaCO_3$. Mit verschiedenen Bakterienkulturen geimpft, Luft aus den Kolben mit CO_2 verdrängt, Gärverschuß aufgesetzt. Etwa vom 4. Tag an (und sodann alle 4 Tage) je 10 ccm Probe entnommen zur Bestimmung des Ca-Gehaltes der Lösung (nach vollständigem Abneutralisieren)² und 2 ccm zur Zuckerbestimmung nach LEHMANN-MAQUENNE-SCHOORL (vgl. S. 164). — Sobald man so die grundsätzliche Auswahl der geeignetsten Kulturen getroffen hat, setzt man nochmals mit diesen Kulturen eine analoge Versuchsreihe an und prüft nun die entnommenen Proben auf ihren Gehalt an flüchtigen Säuren durch Destillation mit Wasserdampf und Titration der Destillate.

Bakterienkulturen, die längere Zeit in festen Nährböden (Agar-Stichkulturen) gezüchtet wurden, müssen des öfteren in ein flüssiges Medium (etwa wie oben) überimpft werden, und erlangen so ihre Gärkraft zurück. Kulturen mit geschwächtem Gärvermögen bilden vielfach nur Milchsäure.

b) **Analytischer Gärversuch unter quantitativer Verfolgung des Gärverlaufes.** Nährlösung: 60 g Glucose, 4 g K_2HPO_4 und 10 g Kochsalz in 1900 ccm Hefeextrakt (1:10)¹. Nach dem Sterilisieren 40 g steriles $CaCO_3$ zugesetzt und mit 100 ccm einer 24 Stunden alten gärkräftigen Bakterienkultur (in der gleichen Nährlösung) geimpft. 14—20 Tage bei 37°. Vom 10. Tag an in Intervallen von je 2 Tagen Entnahme von Proben, und zwar: 200 ccm nach Zusatz von etwas Fullererde oder Bolus alba filtriert, 20 ccm des Filtrates zur Bestimmung des Ca-Gehaltes (vgl. oben), 10—20 ccm für die Milchsäurebestimmung, 50 ccm für die Ermittlung der flüchtigen Säuren und 2—5 ccm für die Glucosebestimmung (vgl. oben).

Bestimmung von Propionsäure und Essigsäure. 50 ccm Filtrat (entsprechend etwa 1,5 g Glucose) mit Schwefelsäure angesäuert,

¹ Empfohlen von WILSON, FRED und PETERSON: Biochem. Z. 229, 271 (1930), Herstellung vgl. S. 134.

² Dies ist unbedingt erforderlich, da die Lösung stets noch sauer ist. Man erhitzt zunächst mit etwas $CaCO_3$ und versetzt dann vorsichtig nach Hinzufügen von Phenolphthalein mit Kalkwasser.

etwa 10 Minuten unter Rückflußkühlung gekocht (Vertreibung des CO_2) und dann mit Wasserdampf destilliert. 400 ccm Destillat aufgefangen (enthält stets praktisch alle flüchtigen Säuren). Feststellung des Gesamtsäuregehaltes durch Titration einer Probe (10—20 ccm). Ferner 200 ccm der Halbdestillation unterworfen (Apparatur vgl. in Abb. 28)¹, 100 ccm Destillat mit $n/10$ -Lauge titriert. Berechnung der Menge an Propion- und Essigsäure auf Grund der folgenden Gleichungen:

$E + P = \text{Gesamtacidität in 200 ccm} (= a).$

$0,366 E + 0,585 P = \text{Acidität in 100 ccm Destillat} (= b)^2$ daraus ergibt sich:

$$P = \frac{b - 0,366 a}{0,219} \text{ und } E = a - P$$

P und E in ccm Lauge ausgedrückt. 1 ccm $n/10$ Lauge = 7,4 mg Propionsäure, bzw. 6 mg Essigsäure.

Isolierung und Identifizierung der Propion- und Essigsäure.
Restliche Gärmaische bei Versuchsabbruch nach Entnahme einer

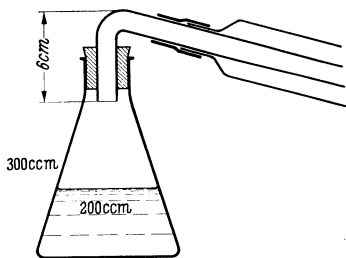


Abb. 28. Apparatur zur Halbdestillation.

Probe für die Analysen (wie zuvor beschrieben) mit Schwefelsäure angesäuert, zunächst etwa 1000 ccm abdestilliert, sodann mittels Wasserdampf noch etwa 2—3 l Destillate vereinigt, mit Bariumhydroxyd neutralisiert, auf ein kleines Volumen verdampft, mit Schwefelsäure angesäuert, filtriert, mit Natriumsulfat gesättigt, mit Äther im Extraktionsapparat 2 Tage extra-

hiert. Äther abdestilliert, Rückstand über eine kleine WIDMER-Kolonnen fraktioniert destilliert. 5—6 Fraktionen im Intervall von 100 bis etwa 145° aufgefangen (Kp. der Essigsäure 118° , der Propionsäure 141°). Darstellung der Bromphenacyl ester der Essigsäure und Propionsäurefraktion: etwa 0,2 ccm der betreffenden Fraktion mit der berechneten Menge konzentrierter Lauge neutralisiert, mit 0,5 g p-Bromphenacylbromid versetzt und mit 10 ccm 95%igem Alkohol 1 Stunde auf dem Wasserbad erwärmt. Beim Erkalten (eventuell bei 0°) Abscheidung der p-Bromphenacyl ester, aus 95%igem Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt des Essigsäure-p-Bromphenacyl esters 86° , des Propionsäureesters $63,4^\circ$.

¹ Gemäß VIRTANEN und PULKI: Amer. Soc. 50, 3138 (1928).

² 0,366 ist ein Faktor, der der Flüchtigkeit der Essigsäure bei der Halbdestillation entspricht (36,6%), ebenso bei Propionsäure.

Isolierung und Identifizierung der Milchsäure und Bernsteinsäure. Destillationsrückstand (nach Entfernung der flüchtigen Säuren) im Vakuum auf etwa 50 ccm eingengt, mit Natrium- oder Ammonsulfat gesättigt und im Flüssigkeitsextraktor mit Äther erschöpfend extrahiert. Äther abdestilliert und Rückstand identifiziert.

c) **Präparativer Gärversuch**¹. Man sterilisiert in einem 15 l-Kolben², fraktioniert 5 l Hefeautolysat (1:5, also aus 1 kg Preßhefe hergestellt), das 0,4% KH_2PO_4 und 1% NaCl enthält und setzt dann 5 l einer sterilen 10%igen Rohrzuckerlösung sowie 100 g durch 2stündiges Erhitzen auf 120° sterilisiertes CaCO_3 zu. Dann impft man mit 500 ccm einer in kräftiger Gärung befindlichen Kultur eines Propionsäurebakteriums (im gleichen Medium). Außerdem fügt man noch 20 ccm (0,2% des Ansatzes) einer 24stündigen Kultur des *Lactobacillus casei* (im gleichen Nährmedium oder in Molke usw.) hinzu³. — Nach dem Verschließen mit einem Gäraufsatz läßt man bei 37° gären und setzt etwa am 6. und 9. Tag noch je 100 g steriles CaCO_3 hinzu und schüttelt (oder rührt) täglich des öfteren gut um. Vom 8. Tag an werden Proben entnommen und auf das Reduktionsvermögen geprüft (vgl. a).

Aufarbeitung (sobald das Reduktionsvermögen nur noch schwach ist): Vergorene Maische abgefüllt, aufgeköcht, mit gelöschtem Kalk völlig abneutralisiert und filtriert. In einem aliquoten Teil (100 ccm) werden die analytischen Bestimmungen (wie unter b) vorgenommen. Der Rest wird auf dem Wasserbad auf etwa 1 l eingedampft, mit konzentrierter Phosphorsäure angesäuert (Kongorot) und der Wasserdampfdestillation unterworfen (Endpunkt durch Titration von Proben ermittelt). Destillat (etwa 15 l) in einer großen Flasche aufgefangen, 50 ccm entnommen und titriert, die berechnete Menge starker Natronlauge⁴ zur Hauptmenge zugesetzt (Phenolphthalein) und auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft. Rückstand pulverisiert, bei 120° völlig getrocknet und aus einem Destillierkolben nach vorsichtigem

¹ Nach Versuchen von J. JAKOWATZ: Diss., Prag 1938.

² Man kann auch in einer vorher sterilisierten WOLFFSchen Flasche arbeiten wie in Übung 22 b.

³ Dadurch kann die Ausbeute wesentlich gesteigert bzw. die Gärung sehr beschleunigt werden; außerdem wird das Verhältnis Propionsäure zu Essigsäure noch weiter zugunsten der ersten verschoben (vgl. SHERMAN und Mitarbeiter: Ind. Chem. 15, 729; 16, 122 (1924); J. Dairy Sci. 6, 303 (1923). — WILSON, FRED und PETERSON: Biochem. Z. 229, 271 (1930).

⁴ Nicht Kalilauge, da die K-Salze hygroskopisch sind.

Zusatz der erforderlichen Menge konzentrierter Schwefelsäure unter Benutzung eines Ölbadestillierapparats. Trennung der Essigsäure und Propionsäure durch wiederholte Rektifizierung mit Hilfe einer WIDMER-Kolonnenapparatur. Essigsäure Kp. 118°, Propionsäure Kp. 141°.

d) Bernsteinsäurebildung durch Bakterien-Trockenpräparate¹. 40 ccm 0,54 n-Phosphatlösung vom p_H 6,2 mit 1,4 g Glucose, 4,5 g Bakterientrockenpräparat (Herstellung vgl. Übung 21 b) und 1 ccm Toluol versetzt, bei 37° in einem mit Gärverschluss versehenen Kölbchen unter öfterem Schütteln etwa 90 Stunden stehen gelassen. Feststellung des Veresterungsgrades durch Bestimmung des freien Phosphates (an 2—4 ccm; Methode vgl. Nachtrag), Bestimmung des Glucosegehaltes (an 1—2 ccm). Der Rest der Lösung wird mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf destilliert. Destillat titriert (ergibt nur Essigsäure), Destillationsrückstand auf ein kleines Volumen verdampft, mit Natriumsulfat gesättigt und mit Äther im Extraktionsapparat 2 Tage extrahiert. Der nach dem Entfernen des Äthers verbleibende krystallinische Rückstand wird in Wasser aufgenommen und titriert. Nach dem Ansäuern isoliert man die Bernsteinsäure und identifiziert sie durch den Schmelzpunkt (183°).

26. Übung:

Umwandlung von Milchsäure und Brenztraubensäure in Propionsäure und Essigsäure.

a) Vergärung von Ca-Lactat unter anaeroben Bedingungen. In einem Kolben 200 ccm Lösung, enthaltend 5 g Milchsäure, 4 g Pepton, 0,4 g K_2HPO_4 und 1 g NaCl (gelöst in Leitungswasser); 4 g $CaCO_3$ zugesetzt, sterilisiert, Flüssigkeit mit CO_2 gesättigt, Luft oberhalb der Flüssigkeit durch CO_2 verdrängt, Gärverschluss mit Hg gefüllt. Geimpft mit 10 ccm einer Lactatbouillonkultur eines gärkräftigen Propionsäurebacteriums. Nach 12—14 Tagen bei 37° ist die Gärung in der Regel beendet. Filtriert, ausgewaschen, auf 250 ccm aufgefüllt. 50 ccm Lösung (entsprechend ursprünglich 1 g Milchsäure) für die Bestimmung von Propionsäure und Essigsäure gemäß Übung 25b².

Identifizierung der Propionsäure und Essigsäure: 50 ccm Filtrat mit Schwefelsäure angesäuert, mit Wasserdampf 100 ccm abdestilliert, diese mit NaOH genau neutralisiert, auf etwa 25 ccm

¹ Vgl. VIRTANEN: Soc. Sci. Fenn. 2, 20 (1925).

² Nach VIRTANEN (Soc. Sci. Fenn. 1, 36, 1923) ist das Verhältnis Propionsäure:Essigsäure unter diesen Bedingungen etwa 3:1, unter aeroben Bedingungen etwa 2:1.

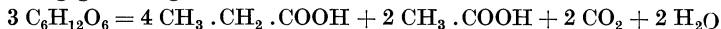
verdampft und mit je 4 ccm 10%iger Silbernitratlösung fraktioniert gefällt. Erste und letzte Fraktion analysiert (Ag-Bestimmung). Ag-Propionat enthält 59,67%, Ag-Acetat 64,67% Ag.

b) **Vergärung von Ca-Lactat unter Messung des entwickelten Gases.** Genau analog dem vorangehenden Versuch, aber nur 50 ccm Nährlösung. Versuchsanordnung analog wie in Übung 4c. Feststellung der Zusammensetzung des Gases.

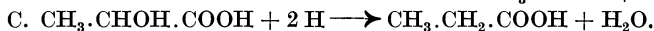
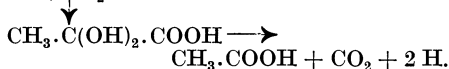
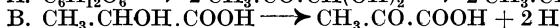
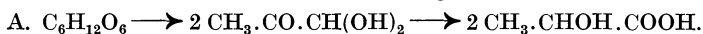
c) **Vergärung von brenztraubensaurem Calcium.** Grundnährlösung wie bei a. Zusatz von 1,5 g frisch destillierter Brenztraubensäure¹ und 2 g CaCO₃, sodann sterilisiert und wie oben geimpft. Nach 8—10 Tagen (sobald die Reaktion auf Brenztraubensäure mit Nitroprussidnatrium und Piperidin negativ ist) Aufarbeitung in üblicher Weise, Bestimmung von Propion- und Essigsäure wie oben².

Anhang: Chemismus der Propionsäuregärung.

Glucosegärung: Einleitende Phasen wahrscheinlich analog denen der alkoholischen Gärung unter Phosphorylierung³. Bildung von Phosphoglycerinsäure durch die Bakterien in Gegenwart von Toluol und Fluorid aus Glucose und Phosphat, insbesondere mit Acetaldehyd oder Brenztraubensäure als H₂-Acceptoren⁴. Theoretische Gärungsgleichung:



Verhältnis Propionsäure: Essigsäure daher theoretisch 2:1 (wie bei der Lactatvergärung, vgl. unten), beobachtetes Verhältnis bis zu 4,2:1. Hypothetische Erklärung desselben: Hydrierung leicht reduzierbarer Zwischenprodukte der Glucosespaltung (wie Glycerinaldehyd, Methylglyoxal) unter Mitwirkung von Wasserstoffdonatoren des Substrates (Hefeextrakt usw.)⁵. Gärungsschema:



¹ Da Brenztraubensäure beim Sterilisieren in der Hitze zum Teil verändert wird, ist es zweckmäßig bei genauen Versuchen (Bilanzversuchen) die Lösung derselben durch Filtration keimfrei zu machen (vgl. S. 42).

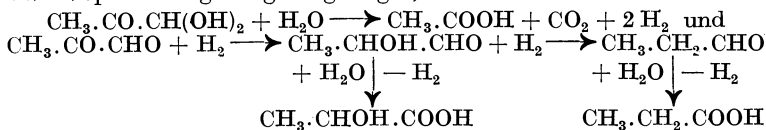
² Unter aeroben Bedingungen ist das Verhältnis Propionsäure: Essigsäure etwa 1:1,8, unter anaeroben Bedingungen etwa 1:1,4.

³ VIRTANEN: Soc. Sci. Fenn. 2, 28 (1925). — VIRTANEN und KARSTRÖM: Acta chem. Fenn. B 7, 17 (1931).

⁴ WOOD, STONE und WERKMAN: Bioch. J. 31, 349 (1937); WERKMAN, STONE und WOOD: Enzymologia 4, 24 (1937).

⁵ VAN NIEL: Die Propionsäurebakterien, Haarlem 1928. — Vgl. auch WOOD und WERKMAN: J. of biol. Chem. 105, 63 (1934).

Es wurde sodann noch eine *zweite Möglichkeit* für den Ablauf der Propionsäuregärung aufgezeigt¹, und zwar:



Eine *dritte Möglichkeit* ergibt sich schließlich auch noch aus der Beobachtung über die Decarboxylierung der Bernsteinsäure unter Bildung von Propionsäure und CO_2 ²:

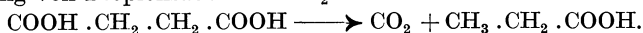


Tabelle XVII.

Zwischenprodukte	Bildung, Abfangung, Anhäufung derselben	Umwandlung derselben
Methylglyoxal	aus Hexose-diphosphorsäure durch Bakterienpräparate ³	in Milchsäure durch Trockenpräparate ⁴
Milchsäure	Nachweis merklicher Mengen während der Gärung ⁵	Propionsäure und Essigsäure ⁶
Brenztraubensäure	bei der Sulfitgärung der Glucose ⁷	Propionsäure und Essigsäure ⁸
Glycerin	—	Propionsäure ⁹ vgl. unten
Propionaldehyd	bei der Sulfitgärung des Glycerins ¹⁰	—

¹ WOOD und WERKMAN: Proc. Soc. exper Biol. a. Med. **31**, 938 (1934).

² WOOD, STONE und WERKMAN: J. Bacter. **29**, 84 (1935). — STONE, ERB und WERKMAN: Proc. Soc. exper Biol. a. Med. **33**, 483 (1936). — Vgl. auch HITCHNER: J. Bacter **28**, 473 (1934); C. **1935**, I, 2833.

³ PETT und WYNNE: Trans. roy. Soc. Canada **27**, 119 (1933).

⁴ NEUBERG und GORR: Biochem. Z. **165**, 482 (1925).

⁵ FOOTE, FRED und PETERSON: C. Bacter. II **82**, 372 (1930).

⁶ Zahlreiche Angaben.

⁷ WOOD und WERKMAN: J. of biol. Chem. **105**, 63 (1934); — Biochemic. J. **28**, 745 (1934); Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **31**, 938 (1934).

⁸ VIRTANEN: Soc. Sci. Fenn. **1**, 36 (1923); — VAN NIEL: The propionic acid bacteria, Monographie, Haarlem, 1928. — WOOD und WERKMAN: Biochemic. J. **28**, 745 (1934).

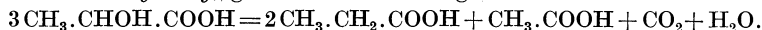
⁹ VAN NIEL: Die Propionsäurebakterien, Haarlem, 1928. — WOOD und WERKMAN: Biochemic. J. **30**, 48 (1936).

¹⁰ WOOD und WERKMAN: Proc. Soc. exper Biol. a. Med. **31**, 938 (1934).

Die Propionsäure scheint daher auf mehr als einem Weg gebildet zu werden, ohne daß sich bisher entscheiden läßt, unter welchen Bedingungen der eine und unter welchen der andere beschritten wird.

Bildung und Umwandlung von Zwischenprodukten vgl. Tab. XVII, S. 178.

Lactatvergärung, gemäß der Gleichung:



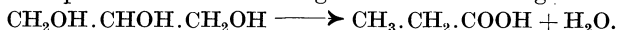
Theoretisches Verhältnis Propionsäure:Essigsäure daher = 2:1, beobachtetes Verhältnis 1,8:1, Erklärung dieses Unterschiedes durch VAN NIEL¹: Die Bildung von Bernsteinsäure durch Hydrierung von Asparaginsäure (aus Eiweißstoffen des Substrates) ergibt das fehlende Äquivalent; besonderer Zusatz von Asparagin drückt das Verhältnis Propionsäure:Essigsäure bis auf 1,6:1 herab, unter Bildung der entsprechenden Menge Bernsteinsäure.

Pyruvatgärung, gemäß der Gleichung:



Theoretisches Verhältnis Propionsäure:Essigsäure ist daher 1:2 (= 0,5) beobachtetes Verhältnis etwa 0,55–0,7.

Glycerinvergärung. Unter anaeroben Bedingungen wurde zunächst eine ohne Gasbildung verlaufende, praktisch quantitative Umwandlung in Propionsäure beobachtet¹ gemäß der Gleichung:



Sodann konnte jedoch gezeigt werden, daß der Gärverlauf viel komplizierter ist, und daß neben Propionsäure auch Essigsäure und recht erhebliche Mengen Bernsteinsäure gebildet werden, wobei bemerkenswerterweise auch eine Verwertung des in Form von CaCO_3 hinzugefügten CO_2 stattfindet².

Die Bernsteinsäurebildung bei der Propionsäuregärung. Dieser Prozeß findet auch normalerweise in größerem oder kleinerem Umfang stets statt. Bei der Verwendung von Bakterienpräparaten in Gegenwart von Toluol bleibt die eigentliche Propionsäuregärung auf der Phosphorylierungsstufe stehen und es wird ohne Gasbildung nur Bernsteinsäure und Essigsäure gebildet³. Dies wurde durch den Zerfall des Hexosemoleküls in C_4 - und C_2 -Ketten erklärt (vgl. auch S. 17).

Sodann wurde aber die sehr wichtige Beobachtung gemacht, daß auch aus Glycerin neben Propionsäure Essigsäure und Bernsteinsäure gebildet werden, wobei zugleich eine Verwertung von CO_2 aus dem zugesetzten CaCO_3 stattfindet; das CO_2 scheint dabei als H_2 -Acceptor zu wirken². In diesem Fall besteht daher die Möglichkeit, daß die Bernsteinsäure doch auf synthetischem Weg aus einer C_2 -Komponente (Essigsäure) entstehen könnte, in ähnlicher Weise wie bei Pilzgärungen (vgl. S. 260). Die Frage betreffend eine C_4 - und C_2 -Spaltung des Hexosemoleküls bleibt vorläufig noch offen und die Bildung von Bernsteinsäure könnte auf mehr als einem Weg erfolgen². Es wurde auch angenommen, daß Bernsteinsäure aus einer C_3 -Verbindung und CO_2 entstehen könnte⁴.

¹ VAN NIEL: Die Propionsäurebakterien, Haarlem, 1928. — Vgl. auch REDTENBACHER: A. 57, 174 (1846).

² WOOD und WERKMAN: Biochemic. J. 30, 48 (1936).

³ VIRTANEN und KARSTRÖM: Acta Chem. Fennica, B. 7, 17 (1931).

⁴ H. G. WOOD und C. H. WERKMANN: Biochemic. J. 32, 1262 (1938).

27. Übung:

Die Coli- und Aerogenesgärung.

a) Herstellung von Massenkulturen¹. Grundsätzlich in gleicher Weise wie in Übung 21 b. Nährlösung: 50 g Rohrzucker, 30 g K_2HPO_4 , 7,5 g $(NH_4)_2SO_4$, 5 g NaCl, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ in 5 l Leitungswasser. Zusatz von 2 n Natronlauge während des Wachstums zur Konstanthaltung des p_H -Optimums 7. Nach etwa 24 bis 48 Stunden (bei längerer Versuchsdauer sind die Bakterien weniger wirksam), bei 37° wird die Bakterienmasse gewonnen (vgl. Übung 21 b). Man erhält etwa 10—15 g feuchte Bakterien.

b) Feststellung des Gärverlaufes bei verschiedenem p_H ¹. Benutzung der gleichen Apparatur wie in Übung 29 a. Ansatz a: 2 g Glucose, 3 g $CaCO_3$, 1—2 g Bakterienmasse, auf 150 ccm aufgefüllt. Luft durch CO_2 verdrängt. Gärdauer etwa 16 Stunden. Anfangs- p_H etwa 6,2, End- p_H etwa 6,4. Ansatz b: 2 g Glucose, 150 ccm m/4 Phosphatpuffer (p_H 7), 1—2 g Bakterienmasse.

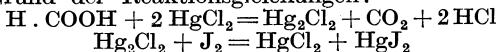
Aufarbeitung: Quantitative Bestimmung von Alkohol und Milchsäure in üblicher Weise (vgl. S. 112 und 160); Bestimmung von Essigsäure und Ameisensäure durch Wasserdampfdestillation eines aliquoten Teiles und Titration; Ermittlung des Ameisensäuregehaltes im Destillat (vgl. unten); aus der Differenz gegenüber der Gesamtaacidität ergibt sich die Menge an Essigsäure. Messung der Gase und Bestimmung der Zusammensetzung derselben (CO_2 und H_2 ; vgl. S. 188).

Bei saurer Reaktion entsteht vor allem Alkohol und CO_2 sowie Milchsäure, bei alkalischer Alkohol und CO_2 , ferner Essigsäure, Ameisensäure und Wasserstoff.

Bestimmung der Ameisensäure nach der Kalomelmethode: Ein aliquoter Teil der Probe (etwa 20—50 ccm) wird mit Lauge genau neutralisiert, dann ein zehnfacher Überschuß 6%iger Sublimatlösung zugefügt, 1 Stunde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und etwas konz. HCl zugesetzt (für 100 ccm 2 ccm HCl). Filtriert, mit heißem Wasser gut ausgewaschen. Filter samt Niederschlag in einem Kolben mit eingeschliffenem Stöpsel mit einer genau abgemessenen Menge n/10-Jodlösung und 10 ccm 10%iger Jodkalilösung übergossen, gut geschüttelt, dann in üblicher Weise mit n/10-Thiosulfatlösung zurücktitriert. Die Differenz ergibt die verbrauchte Menge n/10-Jodlösung; 1 ccm davon entspricht 2,3 mg Ameisensäure². Andererseits entspricht 1 ccm n/10-Lauge 4,6 mg Ameisensäure.

¹ Vgl. ТИХКА: Biochem. Z. 279, 264 (1935).

² Auf Grund der Reaktionsgleichungen:



c) **Äthanol-Butylenglykol-Gärung.** Als Gärungsorganismen verwendet man entweder solche der Aerogenesgruppe¹ oder solche der Aerobacillusgruppe². 200 ccm folgender Nährlösung pro Kolben²: 8% Rohrzucker, 0,25% NH_4Cl , 0,15% K_2HPO_4 , 0,15% CaCl_2 , 0,2% MgSO_4 ; durch Zusatz von m-Sodalösung auf p_{H} 6 gebracht. Impfung mit 2 ccm einer 2 Tage alten Kultur von *Aerobacter pectinovorum*³ (im gleichen Medium zur Entwicklung gebracht). Der p_{H} -Wert wird durch täglichen Zusatz von m-Sodalösung konstant gehalten. Nach 15—18 Tagen bei 37—38⁰ ist die Gärung beendet. Bestimmung von Alkohol, Milchsäure, 2,3-Butylenglykol (eventuell CO_2 und H_2).

*Bestimmung des 2,3-Butylenglykols*⁴. 25 ccm Probe (mit einem Maximalgehalt von 50 mg Butylenglykol) werden zwecks Entfernung des Alkohols (der die Bestimmung stört) aus einem 100 ccm-Kölbchen, das mit einem etwa 20 cm langen Vigreuraufsatz versehen ist, destilliert, bis 17—18 ccm übergegangen sind (diese können zur Alkoholbestimmung verwendet werden⁵). Es bleibt auch ein kleiner, in diesem Fall aber zu vernachlässigender Teil des Methylacetylcarbinols zurück. Man leitet dann zum Ausspülen von oben kurze Zeit Wasserdampf durch den Aufsatz und spült den gesamten Rückstand in ein 100 ccm-Kölbchen; das Volumen soll nun etwa 20 ccm betragen und die Lösung gegenüber Methylorange neutral sein. Man setzt 0,25 ccm Brom zu und schüttelt etwa ½ Minute unter Schutz vor Sonnenlicht, bis das Brom fast ganz gelöst ist. Sodann verbindet man mit einem Rückflußkühler (mittels Schliff), taucht in ein auf 70—80⁰ erhitztes Wasserbad und erwärmt weiter genau 20 Minuten lang auf diese Temperatur. Dann taucht man in kaltes Wasser, spült den Kühler aus und setzt zur Bindung des Bromüberschusses pulverisiertes Ferrosulfat zu (etwa 2,5 g) bis zum Verschwinden von Farbe und

¹ Vgl. SCHAFFER: Diss. Delft 1928.

² FULMER, CHRISTENSEN und KENDALL: Ind. Chem. **25**, 798 (1933); C. 1933, II, 3632.

³ Das Bakterium gehört zwar der Aerobacillusgruppe an (vgl. S. 185), doch verläuft die Gärung analog wie mit Vertretern der Aerogenesgruppe.

⁴ Nach KNIPHORST und KRUISHER: Z. Unt. Lebensm. **73**, 1 (1937). — Hinsichtlich eines Verfahrens zur Bestimmung von Butylenglykol durch Überführung desselben in Acetaldehyd vgl. 1. Auflage dieses Buches S. 146. BROCKMANN u. WERKMAN: Ind. Eng. Chem. **25**, 206 (1933). — HAMMER, STAHLY, WERKMAN u. MICHAELIAN: Jowa Agr. Exp. Stat. Res. Bul. **191** (1935).

⁵ Falls besonders bei den späteren Destillationen zu starkes Schäumen eintritt, so wird die Probe nach dem Neutralisieren mit Natronlauge mit Gips angerührt und 48 Stunden mit Äther extrahiert, der Äther abdestilliert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und ebenso wie oben weiter behandelt.

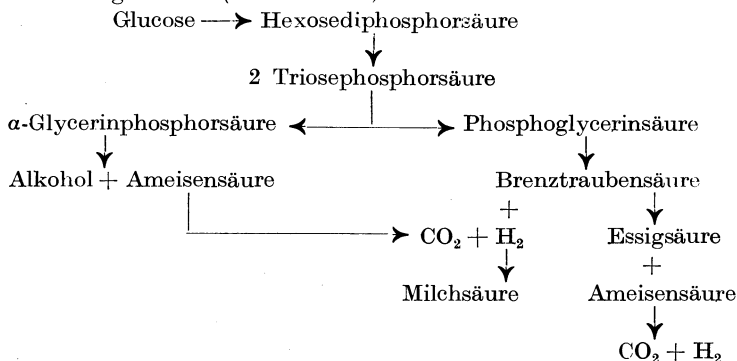
Geruch des Broms. Dann fügt man noch 5 g Ferrosulfat und 20 ccm 30%ige Ferrichloridlösung zu und verfährt in derselben Weise wie bei der Bestimmung des Acetoin (vgl. S. 147). 1 g Nickel-dimethylglyoxim = 0,624 g Butylenglykol. Die Maximalausbeute beträgt bei diesem Verfahren 93%.

Anhang: Chemismus der Coligärungen.

Unterscheidung von drei Gärungstypen (nach KLUYVER¹), und zwar gemäß den wichtigsten diesbezüglichen Gärungserregern: die von *Bact. coli* (in engerem Sinne), die von *Bact. typhosum* und die von *Aerobact. aerogenes* hervorgerufene Gärungsform.

a) Die Coligärung in engerem Sinne. Gärungserreger: *Bact. coli*, *Bact. paratyphosum*, *Bact. Freundii* und andere Arten der Gattungen *Escherichia*, *Salmonella* und *Citrobacter* der amerikanischen Systematik. Das Mengenverhältnis der verschiedenen Gärprodukte ist sehr stark abhängig von dem jeweils verwendeten Bakterienstamm, wie auch von den Versuchsbedingungen², und zwar bleibt die Alkoholmenge in der Regel konstant, Milchsäure wird vornehmlich bei saurer Reaktion gebildet (pH etwa 6,2–6,4), Essigsäure und Ameisensäure insbesondere bei alkalischer Reaktion; die Ameisensäure zerfällt weiter in CO_2 und H_2 .

Gärungsschema (nach TIKKA³):



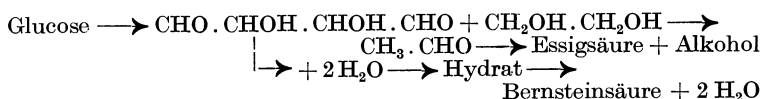
Dieses Schema hat nach ENDO³ eine recht weitgehende Bestätigung erfahren. Es wurde nachgewiesen, daß bei der Zuckervergärung durch Acetontrockenpulver der Colibakterien ähnliche Reaktionskoppe-lungen vorliegen wie im Hefemacerationsaft.

Die bei der Coligärung zugleich auftretende *Bernsteinsäure* (oft bis über 20% des vergorenen Zuckers) soll nach KLUYVER auf folgendem Wege entstehen:

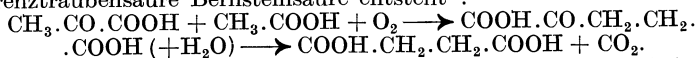
¹ KLUYVER: Erg. Enzymforsch. 4, 230 (1935).

² TIKKA: Biochem. Z. 279, 264 (1935). — Bei der Vergärung von Pentosen muß wohl ein anderer Reaktionsmechanismus angenommen werden. Vgl. dazu A. J. VIRTANEN und T. KIRKKOMÄKI: C 1936 II, 2394.

³ ENDO: Bio. Z. 296, 56 (1938).



Demgegenüber sei auch auf die Vorstellungen über die Bernsteinsäurebildung bei der Propionsäuregärung verwiesen (vgl. S. 179 und Nachtrag). Ferner soll auch die Bernsteinsäurebildung über α -Ketoglutarinsäure in Frage kommen, da bei der bakteriellen Vergärung von Brenztraubensäure Bernsteinsäure entsteht¹:



Die Bildung und Umwandlung von Zwischenprodukten bei der Coligärung ist in Tab. XVIII wiedergegeben.

Tabelle XVIII.

Zwischenprodukte	Abfangung bzw. Anhäufung	Umwandlung
Methylglyoxal	bei zellfreier Gärung aus Hexosediphosphorsäure ²	Dismutation zu Milchsäure ³
Glycerinsäure	—	Essigsäure + Ameisensäure (= CO ₂ + H ₂) ⁴
Phosphoglycerinsäure	mittels Acetonpräparaten ⁵	Brenztraubensäure ⁶ Essigsäure + CO ₂ + H ₂ ⁷
α -Glycerinphosphorsäure	aus Glucose ⁸	Alkohol + Ameisensäure ⁷
Brenztraubensäure	als Stoffwechselprodukt ⁹ mittels Acetonpräparaten ⁵	Essigsäure + Ameisensäure neben Milchsäure ⁷ Acetaldehyd + CO ₂ ¹⁰
Glycerin	—	Alkohol + Ameisensäure ¹¹

¹ ENDO: *Bio. Z.* 296, 56 (1938).

² FROMAGEOT: *Biochem. Z.* 216, 467 (1929). — TIKKA: *Biochem. Z.* 279, 264 (1935).

³ NEUBERG und WINDISCH: *Biochem. Z.* 166, 474 (1925).

⁴ VIRTANEN und PELTOLA: *H.* 187, 45 (1930).

⁵ Aus Hexosediphosphat wie aus Glucose, vgl. ENDO, l. c.

⁶ ANTONIANI: *Biochem. Z.* 267, 376 (1933).

⁷ TIKKA: *Biochem. Z.* 279, 264 (1935).

⁸ Nicht aus Hexosediphosphat; mittels Aceton trockenpräparat. ENDO, l. c.

⁹ QUASTEL: *Biochemic. J.* 19, 304 (1925). — AUBEL und SALABARTAN: *C. r.* 180, 1183, 1784 (1925).

¹⁰ WAGNER: *C. Bacter.* 1, 719 (1913). — NEUBERG und GORR: *Biochem. Z.* 162, 490 (1925). — Vgl. auch SCHEFFER: *Diss. Delft* (1928), sowie GRAAFF und LE FEVRE: *Biochem. Z.* 155, 313 (1925). — Die Brenztraubensäure scheint demnach von *Bact. coli* nicht nur hydroklastisch (also unter Bildung von Essigsäure und Ameisensäure) sondern auch carboxylatisch gespalten zu werden.

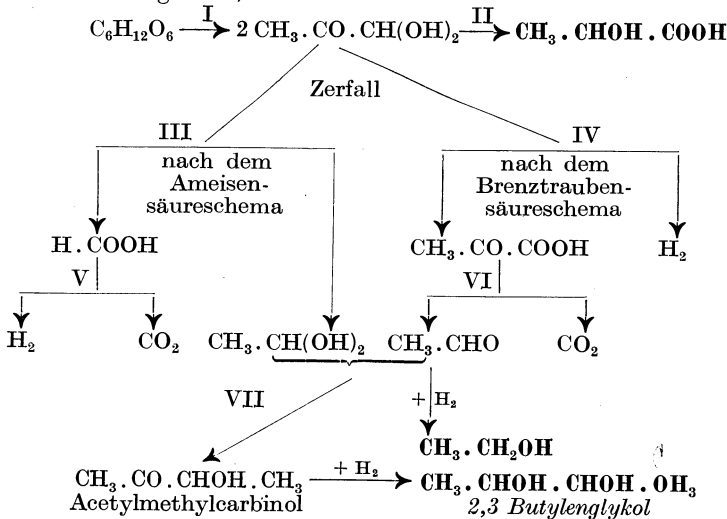
¹¹ HARDEN: *Proc. chem. Soc.* 17, 57 (1901).

Tabelle XVIII (Fortsetzung).

Zwischenprodukte	Abfangung bzw. Anhäufung	Umwandlung
Acetaldehyd	bei der Sulfitgärung ¹	Dismutation zu Essigsäure und Alkohol ²
Äthylenglycol	—	Acetaldehyd und Dismutation desselben ³

b) Die vom *Bact. typhosum* hervorgerufene Gärung. Gärungserreger: außer *Bact. typhosum* auch *Bact. dysenteritis* und gaslose Varianten des *Bact. paratyphosum*. Chemismus im wesentlichen analog wie zuvor⁴, nur daß es nicht zur Spaltung der Ameisensäure und daher zu keiner Gasentwicklung kommt.

c) Die Äthanol-Butylenglykol-Gärung. Die Erreger gehören hauptsächlich dem *Aerogenes*-Typ an; ferner wird diese Gärung verursacht durch *Aerobacter cloacae*, *Bac. asiaticus mobile*⁵ u. a. — Gärungsendprodukte: Milchsäure, Äthanol, 2,3-Butylenglykol (oft über 30% des vergorenen Zuckers), CO₂ und H₂. Gärungsschema (aus Bilanzversuchen abgeleitet)⁶:



¹ NEUBERG und NORD: *Biochem. Z.* **96**, 133 (1919). — Vgl. auch PETERSON und FRED: *J. of biol. Chem.* **44**, 29 (1920).

² NEUBERG und WINDISCH: *Biochem. Z.* **166**, 474 (1925).

³ LE FEVRE: *Diss. Utrecht* 1924. — DAMPIER und WHETHAM: *Austral. J. exper. Biol. a. Med.* **4**, 35 (1927).

⁴ HARDEN: *Soc.* **79**, 610 (1901). — SCHEFFER: *Diss. Delft* (1928); TASMANN und POT: *Biochem. Z.* **270**, 349 (1934).

⁵ Vgl. BIRKINSHAW, CHARLES und CLUTTERBUCK: *Biochemic. J.* **25**, 1522 (1931); *C.* **1932**, I, 2340. — Der *Bacillus* bildet aus Glucose gegen 30% Butylenglykol neben Milchsäure, Alkohol und flüchtigen Säuren.

⁶ SCHEFFER, *Diss. Delft* 1928.

Reaktion VII soll nach KLUYVER¹ dadurch zustandekommen, daß Acetaldehydhydrat als Abfangmittel für den aus Brenztraubensäure gebildeten Acetaldehyd fungiert (vgl. Acyloinsynthese, S. 155).

Anhäufung und Umwandlung von Zwischenprodukten: Abfangung von Acetaldehyd bei der Sulfitgärung²; Acetylmethylcarbinol ist stets vorhanden³. Vgl. dazu auch Nachtrag.

Eine grundsätzlich analoge Gärungsform wird auch von einer anderen Bakteriengruppe verursacht, nämlich den Aerobacillen (vgl. S. 181).

B. Butyl- und Aceton-Gärungen.

28. Übung:

Züchtung und Untersuchung butylogener und verwandter Bakterien.

a) Anreicherung von butylogenen Bakterien⁴ (Gewinnung natürlicher Reinzuchten). Die hier zur Verfügung stehenden Methoden beruhen darauf, daß die butylogenen Bakterien infolge ihrer Sporenbildung gegen höhere Temperatur widerstandsfähig sind (ein etwa 2 Minuten langes Aufkochen schädigt in der Regel nicht), wogegen Begleitbakterien, die keine Sporen bilden (insbesondere Milchsäurebakterien) abgetötet werden; ferner vermögen die butylogenen Bakterien Stärke direkt zu spalten und zu vergären, was bei Milchsäurebakterien in der Regel nicht der Fall ist⁵. Weiterhin können die Butylbakterien auch bei völligem Sauerstoffabschluß gedeihen. Zur Gewinnung butylogener Bakterien kann man im allgemeinen folgendermaßen vorgehen:

α) Anreicherung in rohen Kartoffeln: Aus ungewaschenen (mit Erde verunreinigten) Kartoffeln sticht man mittels eines Korkbohrers passende Stücke aus und läßt dieselben unter Wasser bei 35—37° in einem verkorkten weiten Reagensrohr stehen. Es setzt bald Gärung ein und nach einigen Tagen sind die Kartoffelstücke gänzlich zerfallen. Zwecks Reinzüchtung wird weiter abgeimpft (vgl. unten).

β) Anreicherung aus Getreideschrot: In einem Kolben werden 25 g fein gemahlener Roggenschrot mit 500 ccm Leitungswasser übergossen, gut umgeschwenkt, das Gefäß 10 Minuten lang im siedenden Wasserbad erhitzt und bei 30—35° aufbewahrt (statt

¹ KLUYVER: Erg. Enzymforsch. 4, 256 (1935).

² NEUBERG und NORD: Biochem. Z. 96, 133 (1919). — NEUBERG, NORD und WOLFF: Biochem. Z. 112, 144 (1920). — Isolierung von Acetoin vgl. TOMIYASU: Bl. Agr. chem. Soc. Japan 13, Nr. 11 (1937).

³ HARDEN: Proc. roy. Soc. Lond. (B) 77, 422 (1936).

⁴ Vgl. HENNEBERG: Hdb. d. Gärungsbakteriologie Bd. 1, S. 107.

⁵ Hinsichtlich Diastase bildender Milchsäurebakterien vgl. DÜLL, Dissertation, Kiel, 1933.

des Leitungswassers kann auch folgende Nährlösung angewendet werden: 1—5% Glucose, 0,5% Pepton, 0,5% LIEBIGS Fleischextrakt und 0,5% Kreide). Die Art der so erhältlichen Bakterien ist vielfach von der Getreideart abhängig; so erhält man bei Verwendung von Maisschrot häufig zur Butylalkoholherzeugung geeignete Bakterien.

γ) Anreicherung aus Erde: Dünne Kleisterlösung oder eine etwa 2%ige Getreideschrotaufschwemmung wird eine Zeitlang aufgekocht und dann mit etwas Erde versetzt. Sofort nach dem Zusatz korkt man die Kulturgefäße (Reagensröhrchen) gut zu und läßt bei 30—35° stehen.

In den durch Aufkochen bewerkstelligten Anreicherungen finden sich neben den butylogenen Bakterien fast regelmäßig Heubacillen und *Bac. megatherioides*, die noch widerstandsfähigere Sporen bilden¹. Diese Formen sind durch die Hautbildung charakterisiert, ihre Zellen färben sich mit Jod niemals blau, während sich die Zellen butylogener Bakterien zumeist blau färben. Die genannten Begleitorganismen werden von den Butylbakterien insbesondere durch die Säurebildung sowie durch Anwendung anaerober Bedingungen unterdrückt.

b) Herstellung absoluter Reinzuchten von Butylbakterien. Für die eigentlichen Butylbakterien benutzt man die Anaerobenkultur. Eine Schwierigkeit der Reinzüchtung besteht darin, daß die Butylbakterien bei Benutzung fester Nährböden (Agar, Gelatine) vielfach nicht gut zur Entwicklung gelangen (insbesondere das Auskeimen der Sporen ist meist erschwert oder verzögert, manchmal völlig gehemmt). Man stellt nach der Verdünnungsmethode in physiologischer Kochsalzlösung oder unter Benutzung dünner Getreidemaische (vgl. S. 34) den gewünschten Verdünnungsgrad her (etwa 1:1000 usw. vgl. S. 46 und 89) und impft nun in flüssigen Agar (z. B. Getreidemaischeagar usw.) ein, verteilt das Impfmateriale in demselben und gießt auf Platten. Die PÉTRI-Schalen mit den geimpften Agarplatten werden dann in einem Apparat für Anaerobenzüchtung (vgl. S. 49) bei 35—37° belassen. Nachdem sich Bakterienkolonien gebildet haben, werden diese mikroskopisch untersucht und dann

¹ Hinsichtlich der Hitzeresistenz mancher Bakterien sei noch auf folgendes hingewiesen: Das Acetonebacterium (*Bac. macerans*), das wegen seiner Säureempfindlichkeit von den Butylbakterien stets verdrängt wird, vermag in Sporenform 100° länger als 2 Stunden auszuhalten (sogar 115° während 15 Minuten); dasselbe ist ferner aerob, so daß es mit Hilfe dieser Eigenschaften von den Butylbakterien getrennt werden kann (z. B. auf von Luft umgebenen, aseptisch gewonnenen Kartoffelkeilen).

weiter überimpft; der Prozeß wird gegebenenfalls noch des öfteren wiederholt.

Sodann stellt man das Gärvermögen der so gewonnenen Kulturen fest (Beobachtung des Eintritts und der Intensität der Gärung; vgl. unten). Insbesondere bei Buttersäurebakterien wurde festgestellt, daß absolute Reinkulturen zu langsam und unvollständig die Stärke bzw. den Zucker vergären und manchmal frühzeitig absterben. Dagegen arbeiten Bakteriengemische (natürliche Reinzuchten) meist günstiger. So läßt sich auch bei Verwendung von Reinkulturmischungen von Butylbakterien mit Heubacillen vielfach eine Anregung der Gärung feststellen.

c) Fortzüchtung der butylogenen Bakterien. Empfehlenswerter als die Fortzüchtung auf Agarböden (z. B. Stichkultur in Maischeagar) ist die Weiterzüchtung der butylogenen Bakterien in Getreidemaische oder in einer 5—6%igen Aufschwemmung von Getreideschrot (Korn, Mais usw.); auf gute Sterilisation der Nährböden (fraktioniert im Autoklaven) ist dabei zu achten.

Zur Konstanthaltung des Gärvermögens (bzw. zur jedesmaligen Aktivierung) der Kulturen der Butylalkohol-Acetonbakterien ist eine Pasteurisierung von Wichtigkeit¹ (bei der die vegetativen bzw. weniger aktive Zellen abgetötet werden): 10 ccm einer 6%igen Kornschrotaufschwemmung (vgl. S. 34, Nr. 9) in einem Reagenrohr werden mit der Kultur geimpft, 1 Minute in siedendes Wasser eingetaucht, gekühlt und bei 37° aufbewahrt. Eine aktive Kultur soll nach 20—24 Stunden kräftige Gärung zeigen. Mit Hilfe dieser Methode gelingt auch die Auswahl der aktivsten Kulturen (vgl. oben), was besonders in diesem Fall für die Konstanterhaltung des Gärvermögens sehr wichtig ist. Art der Durchführung vgl. S. 52.

Auffrischung des Gärvermögens degenerierter Kulturen. Falls Kulturen längere Zeit nicht überimpft wurden und sie in ihrem Gärvermögen geschwächt sind, können sie manchmal schon durch öftere Überimpfung unter Pasteurisierung (wie zuvor beschrieben) aufgefrischt werden; falls dies nicht zum Ziel führt, so impft man die Kultur in eine sterile Aufschwemmung von Gartenerde ein und führt eine Wechselüberimpfung auf Gartenerde und Kornschrotaufschwemmung durch. Die Versuche zur Wiederaktivierung degenerierter Kulturen werden zweckmäßig unter streng anaeroben Bedingungen durchgeführt. Auch diese Methode versagt manchmal.

¹ Vgl. REYNOLDS, COILE und WERKMAN: *Jowa St. Coll. J. of Sc.* 8, 415 (1934). — LANGLYKKE, PETERSON und MC COY: *J. Bacter.* 29, 333 (1935).

29. Übung:

Die Butanol-Aceton-Gärung.

a) **Kleinversuch mit Auffangung und analytischer Bestimmung der Gase.** Apparatur in Abb. 29 wiedergegeben. Im Gärkolben A 50 ccm 6%iger Kornschrotmaische (im Autoklav sterilisiert), mit 1 ccm einer gärkräftigen Kultur (*Clostr. acetobutylicum*, *Clostr. butylicum* oder anderen) geimpft, mit CO_2 gesättigt (durch sterile Watte filtriert), Volumen über der Flüssigkeit mit CO_2 gefüllt, zunächst gut verschlossen.

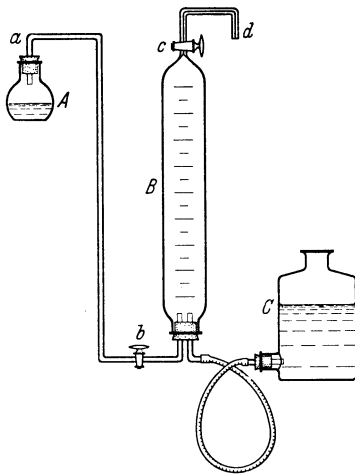


Abb. 29. Gärgerät.

Hahn b geschlossen, Capillarahn c geöffnet, Eudiometerrohr B (etwa 1 l Inhalt) durch Hochheben von C vollständig mit Wasser gefüllt und auf gleiches Niveau gebracht. Bei a eine CO_2 -Bombe angeschlossen und CO_2 nach vorsichtigem Öffnen von b eingeleitet. Wasser mit CO_2 gesättigt (etwa 10 Minuten durchleiten); b geschlossen, CO_2 -Bombe abgestellt, c geschlossen, C in Ruhelage gebracht (wie in Abb. 29) Gärkolben bei a (Gummistöpsel) rasch angeschlossen. Nach 2 Stunden bei 37° durch kurzes Öffnen von c, nach Hochheben von C eventuell angesammeltes Gas abgelassen; C wieder in Ruhelage gebracht; Vorgang nach weiteren 2 Stunden eventuell nochmals wiederholt. Sodann C tief gestellt und b vorsichtig geöffnet. Nach 8—10 Stunden ist die Gärung in Gang; Gasentwicklung beginnt. Volumen etwa alle 6—8 Stunden abgelesen, nach Schließen von b und Heben von C auf das gleiche Flüssigkeitsniveau wie in B. Nach Beendigung der Gärung (Gasvolumen in B konstant geworden) wird das Gasvolumen abgelesen (gibt die Gesamtmenge von CO_2 und H_2 bei 37° , Atmosphärendruck ablesen). Feststellung der Zusammensetzung des Gases: bei d wird eine Gaspipette angeschlossen, Gasprobe entnommen, gemessen und in üblicher Weise über Kalilauge von CO_2 befreit; Restgas = H_2 , Differenz = CO_2 .

b) **Gärversuch mit analytischer Bestimmung aller Gärprodukte und unter Kontrolle der Gasbildung.** 100 ccm Maische, Zusammen-

setzung wie oben, Durchführung der Gärung und Handhabung des Apparates wie unter a). Entnahme des Gases von der 24. Stunde der Gärung an etwa alle 8 Stunden, Überführung in die Gaspipette und Analyse wie bei a. (Wiedergabe der in bestimmten Zeiten entwickelten Gesamtmengen der beiden Gase in Form von Kurven.) Bestimmung der sonstigen Gärprodukte nach Beendigung der Gärung gemäß folgendem Analysengang¹:

Allgemeine Trennung der Gärprodukte: Vergorene Maische unter Nachwaschen mit 20 ccm Wasser in das Destilliergefäß eingefüllt (Apparatur vgl. Abb. 30), durch Zusatz von 20 ccm n-Lauge alkalisch gemacht und nach Zusatz von Siedesteinchen genau 100 ccm abdestilliert (Ansatzrohr durch einen Schliffstöpsel verschlossen). Im Destillat (A) befindet sich nun Aceton, Butanol, Äthanol und Acyloin. Kolbenrückstand mit einem geringen Überschuß 2 n-Schwefelsäure versetzt und mit Wasserdampf destilliert (Einführungsrohr für den Wasserdampf eingesetzt); genau 220 ccm Destillat (B) in einem Maßkolben aufgefangen; dieses Destillat enthält Essig- und Buttersäure (eventuell Ameisensäure).

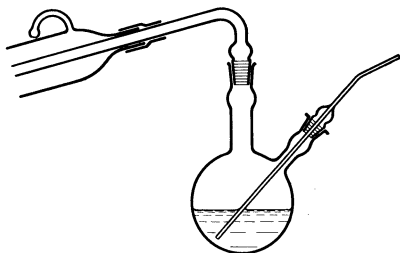


Abb. 30. Destillierapparat für analytische Zwecke.

*Bestimmung von Äthanol und Butanol*². 5–8 ccm vom Destillat A (maximal 15 mg Gesamtalkohole enthaltend) in eine Proberröhre (aus Jenaer Glas oder Pyrex-Glas, Dimensionen 20 × 200 mm) gebracht, 10 ccm Oxydationslösung (bestehend aus gleichen Teilen einer genau 3 n-Kaliumbichromatlösung und einer genau 10 n-Schwefelsäurelösung, unter Anwendung von CO₂-freiem Wasser hergestellt) zugesetzt; Volumen mit CO₂-freiem Wasser auf 25 ccm gebracht, mit einem feststehenden Gummistöpsel verschlossen, 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt, dann unter der Wasserleitung abgekühlt, Siedesteinchen zugesetzt und mit dem Kühlrohr (Durchmesser 8 mm) der Mikrodestillationsapparatur (vgl. Abb. 31) verbunden. Destillation unter völlig konstanten Bedingungen durchführen (Manometer mit Druckregler): Zweimal je 10 ccm Destillat in je 6–7 Minuten auffangen. Jede Fraktion sodann mit

¹ Im Prinzip gemäß den Angaben von JOHNSON, PETERSON und FRED: J. of biol. Chem. 101, 145 (1933).

² Nach der Mikromethode von JOHNSON: Ind. Chem., Anal. Ed. 4, 20 (1932).

CO₂-freiem Wasser in einen 50 ccm-ERLENMEYER-Kolben spülen und mit 0,02 n-Barytlaug aus einer Mikrobürette titrieren; als Indikator Phenolrot (0,1 g in 2,85 ccm n/10-Natronlaug gelöst, auf 500 ccm aufgefüllt). Endpunkt: dauernde Rosafärbung.

Berechnung der Werte für Butanol (B) und Äthanol (E) in mg:

$$B = \frac{1,334 a - b}{0,0975}, \quad E = \frac{a - 0,098 B}{0,0758},$$

a = ccm n/10-Barytlaug (Faktor der 0,02 n-Barytlaug berücksichtigen) der ersten Fraktion, b der zweiten Fraktion. Von a und b ist noch der Wert der Blindtitration abzuziehen (etwa je 0,01 ccm), ferner von a für je 5 mg Aceton in der Probe der Wert 0,011 abzuziehen und von b der Wert 0,013. Nach Berechnung der mg-Mengen

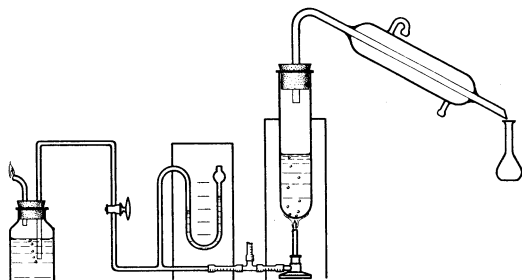


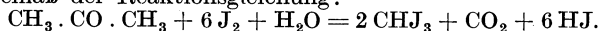
Abb. 31. Mikrodestillationsapparatur.

B und E ist von E noch der dem Acetylmethylcarbinol entsprechende Wert abzuziehen (88 mg Acetylmethylcarbinol = 120 mg Essigsäure = 92 mg Äthanol, daher 1 mg Acetylmethylcarbinol = 1,045 mg Äthanol).

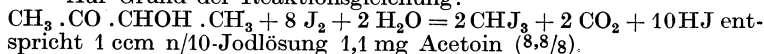
*Acetonbestimmung*¹: 10—15 ccm Destillat A (etwa 10—20 mg Aceton enthaltend), 50 ccm n-NaOH in einer Glasstöpselflasche gemischt, nach 5 Minuten Stehen 25 ccm n/10-Jodlösung unter dauerndem Umschütteln in kleinen Portionen zufließen gelassen. Flasche verschlossen, 3 Minuten kräftig geschüttelt, 20 Minuten stehen gelassen, 25,5 ccm 2 n-H₂SO₄ zugefügt (lackmussauer) und mittels 0,05 n-Thiosulfatlösung (Faktor auf n/10-Lösung berechnet) in üblicher Weise titriert. Differenz ergibt den Jodverbrauch. 1 ccm n/10-Jodlösung = 0,967 mg Aceton². Der Wert für Acetylmethylcarbinol ist zuvor abzuziehen, und zwar 1 mg Acetylmethylcarbinol = 0,909 ccm n/10-Jodlösung³.

¹ Nach der MESSINGER-Methode, verbessert von GOODWIN: Amer. Soc. 42, 39 (1920).

² Gemäß der Reaktionsgleichung:



³ Auf Grund der Reaktionsgleichung:



Bestimmung von Acetylmethylcarbinol: 10—20 ccm des Destillates A wie in Übung 16a behandeln (vgl. S. 147).

Bestimmung des 2,3-Butylenglykols: Ein aliquoter Teil der ursprünglichen Probe wird wie in Übung 27c weiter behandelt (vgl. S. 181).

*Bestimmung von Buttersäure und Essigsäure*¹: 20 ccm vom Destillat B zur Bestimmung der Gesamtacidität (Titration mit n/10-Lauge gegen Phenolphthalein, Wert a); 200 ccm plus 10 ccm Washwasser werden der Halbdestillation unterworfen (vgl. S. 173 und 174) und genau 105 ccm in 65 Minuten abdestilliert und wie oben titriert (Wert b).

Berechnung der Werte für Buttersäure (= B) und Essigsäure (= E) in ccm n/20-Lauge auf Grund der Gleichungen²:

$$E + B = a \text{ und } 0,366 E + 0,74 B = b, \text{ daraus ergibt sich}$$

$$B = \frac{b - 0,366 a}{0,374} \text{ und } E = a - B.$$

Zu den erhaltenen Werten wird noch 10% dazugerechnet, um die in der Gesamtmenge vorhandenen Werte zu erhalten. 1 ccm n/20-Lauge = 4,4 mg Buttersäure bzw. 3 mg Essigsäure.

Umrechnung der Analysenwerte in Glucoseäquivalente. Auf Grund der Gärungsgleichungen entspricht 180 mg Glucose = 58 mg Aceton, 88 mg Buttersäure, 76 mg Butanol, 120 mg Essigsäure, 92 mg Äthanol, 88 mg Methylacetylcarbinol. Der jeweils gefundene Wert in mg ist daher mit dem betreffenden Faktor zu multiplizieren, um die mg-Äquivalente Glucose zu erhalten (so ergibt sich z. B. für Aceton der Umrechnungsfaktor $180:58 = 3,1$).

c) Vergärung unter gleichzeitiger Bildung von Isopropylalkohol. Durchführung ebenso wie Übung 29b. Impfung mit einer gärkräftigen Kultur eines geeigneten Bakteriums³, z. B. *Clostridium butyricum*. Bestimmung der Gärprodukte nach Beendigung der Gärung, und zwar nach dem gleichen Analysengang wie zuvor. Ferner bestimmt man Isopropylalkohol im Destillat A in folgender Weise: 10—15 ccm des Destillates werden ebenso wie bei der Butanol- und Äthanolbestimmung oxydiert (3 Minuten). Aus der Oxydationsmischung wird dann etwa die Hälfte des Volumens abdestilliert und die Acetonbestimmung wie zuvor vorgenommen. Der für das präformierte Aceton er-

¹ Im Prinzip gemäß der Halbdestillationsmethode von VIRTANEN und PULKI: Amer. Soc. 50, 3138 (1928).

² Die Faktoren 0,366 und 0,74 ergeben sich auf Grund der empirischen Feststellung, daß innerhalb gewisser Konzentrationsgrenzen bei der Halbdestillation 36,6% Essigsäure und 74% Buttersäure übergehen.

³ Vgl. LANGLYKKE, PETERSON und McCoy. J. Bacter. 29, 333 (1935).

haltene Wert ist von dem gesamten Aceton-Wert abzuziehen. Die Differenz entspricht dem aus dem Isopropylalkohol erhaltenen Aceton. (Von dem ursprünglich vorhandenen Isopropylalkohol erfaßt man dabei nur etwa 85%, so daß noch mit einem Korrektionsfaktor zu multiplizieren ist).

d) Präparativer Gärversuch (unter analytischer Kontrolle des Gärverlaufes). Vorbereitung der Impfkultur: 20 ccm einer 6%igen Kornmaischekultur des Bakteriums (wie bei b) in 200 ccm der gleichen Maische eingimpft; nachdem Gärung eingesetzt hat (etwa 24 Stunden) wird diese Probe in 2 l der gleichen Maische übertragen und nach weiteren 24 Stunden diese Impfkultur zu der für die Gärung bestimmten 6—8%igen Kornmaische (25 l) zugesetzt¹. Alle Maischen gut sterilisiert (Autoklav), Mikroskopische Kontrolle aller Impfkulturen. Gärapparatur vgl. Abb. 8, S. 73 (Benützung einer Waschflasche mit Sinterglaseinsatz außerhalb des Gärtraumes). Glasballon sowie Kühler vor dem Einfüllen der Maische desinfiziert (mit einer etwa 0,1%igen Sublimatlösung gut ausgespült und mit sterilem Wasser gründlich nachgewaschen). Etwa ½ Stunde nach dem Impfen setzt Gärung ein, nach einigen Stunden ist dieselbe kräftig in Gang. 2—3mal täglich wird durch kräftiges Umschwenken durchgemischt. Nach 3 (eventuell 4) Tagen ist die Gärung in der Regel beendet.

Analytische Kontrolle des Gärverlaufes. Je 100 ccm des Gärungsgutes werden nach 24 Stunden (nach kräftigem Umschütteln) und sodann in Intervallen von je 8 Stunden mittels einer langen Pipette entnommen. Noch zweckmäßiger ist es, wenn gleich ein oben rechtwinkelig abgebogenes Rohr, das unten bis in die Flüssigkeit reicht, einsetzt; an das obere Ende schließt man zwecks Probeentnahme eine Saugprouvette an. — Die Proben werden wie in Beispiel b analysiert. Ergebnisse in Form von Kurven wiedergegeben² (vgl. Abb. 32, die den Verlauf einer normalen Butanol-Acetongärung zeigt³).

¹ Mit gleichem Erfolg kann auch Kartoffelmaische vergoren werden, die etwa 6—8%ig an Trockensubstanz ist (360—500 g Kartoffeln zur Herstellung von 1 l Maische). Ebenso eignet sich Weizen- oder Maisschrot.

² Beim Sinken der Acidität wird zunächst fast ausschließlich Aceton gebildet, erst später auch Butanol, dessen Bildung jedoch weiter geht, während die Acetonbildung schließlich aufhört. Dies ist auch vom p_H -Wert abhängig; Aceton entsteht besonders beim $p_H < 4,5$, Butanol um $p_H 5$ herum; größere Änderungen im p_H im einen oder anderen Sinn führen zu anormaler Gärung. Entstehung von Nebenprodukten (wie Äthanol) anscheinend gegen Ende der Gärung.

³ W. H. PETERSON und E. B. FRED: Ind. Eng. Chem. **24**, 237 (1932).

Technische Kontrolle des Gärverlaufes: Probenentnahmen in den gleichen Zeitintervallen wie zuvor. 10 ccm direkt mit n/20-Lauge titriert, 40 ccm filtriert und spezifisches Gewicht festgestellt (bei 6%iger Maische anfangs etwa 5^o Bllg., am Ende der Gärung etwa 0,5^o)¹.

*Präparative Aufarbeitung:*² Gärgut in Portionen von 6—7 l aus einem 10 l fassenden Rundkolben unter Benutzung einer WIDMER-Kolonne destilliert (vgl. Übung 7 e, S. 112). Destillat in zwei Fraktionen zu etwa je 2—2,5 l aufgefangen. Butanol-

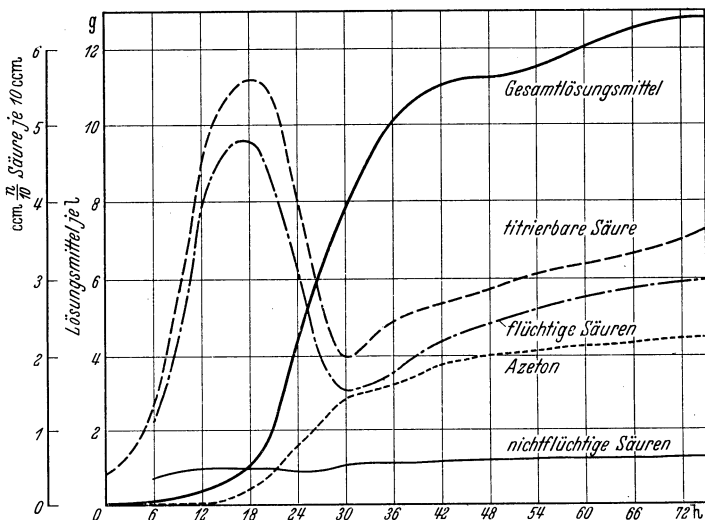


Abb. 32. Verlauf der Butanol-Aceton-gärung.

schichte von der ersten Fraktion abgehoben und wäßrigen Anteil mit der zweiten Fraktion vereinigt. Nach dem Neutralisieren mit Soda destilliert man über eine WIDMER-Kolonne, fängt wieder

¹ Das Schwinden der Acidität ist unerläßliche Bedingung einer guten Vergärung. Bleibt die Acidität erhalten, infolge Anwesenheit fremder Bakterien oder aus irgend einem anderen Grund, so findet keine oder nur geringfügige Bildung von Butanol und Aceton statt. Die Acidität steigt auf etwa 9 ccm n/20-Lauge für 10 ccm Probe, sinkt dann rasch auf etwa 4 ccm und steigt später wieder an [vgl. z. B. PETERSON und FRED: Ind. Chem. **24**, 237 (1932)]. Bei der Vergärung von Kartoffelmätsche liegen die Werte in der Regel wesentlich höher (Absinken bis auf etwa 10 ccm n/10-Lauge für 10 ccm Probe).

² Nach Versuchen von J. JAKOWATZ: Diss., Prag 1938.

zwei Anteile auf und hebt die Butanolschicht ab. Die beiden Fraktionen werden dann getrennt weiter destilliert und die zueinander gehörigen Anteile jeweils vereinigt. Durch Aussalzen mit Pottasche scheidet man weitere Mengen Butanol ab. Schließlich erhält man folgende Fraktionen: reines Aceton (Kp 56°, $d = 0,792$), Zwischenlauf (enthaltend Aceton, Äthanol, Butanol und Wasser) und reines Butanol (Kp 117°, $d = 0,804$). Außer dem Siedepunkt bietet auch die Bestimmung des spezifischen Gewichtes ein Kriterium für die Reinheit der Fraktionen.

Identifizierung des Acetons als p-Nitrophenylhydrazon¹ oder als Dibenzalaceton².

Identifizierung des Butanols als 3,5-Dinitrobenzoyl ester³.

Zur Gewinnung der Säuren kann der oben erhaltene alkalische Anteil und der ursprüngliche Destillationsrückstand dienen. Nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure⁴ wird destilliert und etwa 8—10 l Destillat aufgefangen. Dieses wird mit CaCO₃ und Kalkmilch neutralisiert (p_H 7,3), das Filtrat am Wasserbad zur Trockne verdampft, der Rückstand gut pulverisiert und bei 120° getrocknet. In einem Destillierkolben versetzt man denselben schließlich mit der berechneten Menge konzentrierter Schwefelsäure und destilliert nach gutem Verrühren aus einem Ölbad. Das Destillat wird dann noch fraktioniert destilliert (vorwiegend, manchmal ausschließlich Essigsäure, eventuell etwa Buttersäure).

Anhang I: Theoretisches.

Für die Butanol-Aceton-Gärung ist charakteristisch, daß sie nur bei Anwendung natürlicher Substrate erfolgreich durchgeführt werden kann. Aber auch da sind nicht alle Substrate geeignet. So werden Hafer- und Gerstenmaischen nicht oder nur sehr schwach vergoren. Dies hängt mit dem Fehlen eines Aktivators zusammen, der sich als l-Asparagin erwies⁵ und durch den der Stärkeabbau sehr erleichtert werden soll. Für die Durchführung der Gärung mittels Cl. acetobutylicum in synthetischem Medium ist neben Asparagin noch der Zusatz eines thermostabilen, aus Mais und besonders aus Hefeautolysat erhältlichen Aktivators erforderlich. Derselbe kommt jedoch nur in Gegenwart von Asparagin voll zur Wirkung⁶. Vielleicht handelt es sich dabei aber nicht um einen Gärungsaktivator, sondern um einen Wuchsstoff.

¹ B. 26, 1306 (1893); J. biol. Chem. 4, 235 (1908).

² CONRAD und DOLLIVER: Org. Synth. 12, 22 (1932).

³ Helv. 9, 799 (1926); Am. Soc. 51, 3426 (1929); 54, 3762 (1932).

⁴ Schwefelsäure ist bei längerer Dampfdestillation etwas flüchtig.

⁵ TATUM, PETERSON und FRED: J. Biol. Chem. 27, 2 (1933); 29, 6 (1935).

⁶ WEIZMANN und ROSENFELD: Bioch. J. 31, 619 (1937).

Bedingungen der Butanol-Aceton-Gärung: Von wesentlichem Einfluß auf die Zusammensetzung der entstehenden Gärprodukte ist außer der Art der verwendeten Organismen besonders die Temperatur. Bei Erhöhung derselben bis 40° sinkt die Ausbeute an Lösungsmitteln beträchtlich (vor allem die an Butanol). Bei tieferer Temperatur (etwa 30°) wird die Ausbeute erhöht, die Gärdauer aber verlängert¹.

Anhang II: Technologie der Butanol-Aceton-Gärung.

Ausgangsmaterial: Am besten Reis (da bakteriologisch am reinsten), sodann Mais, Getreidearten, Kartoffeln, Melasse u. a. zucker- oder stärkehaltige Rohstoffe, insbesondere minderwertige, zur Verfütterung nicht geeignete Materialien. Auch Sulfitablauge aus Buchenholz² sowie Molke³ erwiesen sich als geeignet.

Gärungserreger. Besonders *Clostridium aceto-butylicum* (in französischen und U.S.A.-Fabriken). Ob die vielen anderen butylogenen Bakterien (die aber meist nur relativ geringe Butanolausbeuten liefern) von den industriell verwendeten Bakterien wesensverschieden, oder ob die letztgenannten nur an den Nährboden angepaßt bzw. aufgezüchtet sind, ist schwer zu entscheiden. Von großer Wichtigkeit ist die bakteriologische Reinhaltung der Apparate im Betrieb, da die normale Gärung durch fremde Organismen unterdrückt werden kann. Diese Aufgabe ist oft sehr schwierig, da die zur Verwendung kommenden Materialien zumeist stark infiziert sind, und zwar oft mit Bakterien, die gleichfalls sehr widerstandsfähige Sporen besitzen. Kulturen und Maischen sind täglich auf bakteriologische Reinheit und Gärvermögen zu prüfen.

Fabriksbetrieb. Mais fein gemahlen, mit Wasser angerührt, durch Erhitzen unter Druck sterilisiert ($1\frac{1}{2}$ – $2\frac{1}{2}$ Atm., 45–90 Minuten) und Stärke verkleistert. Stärkelösung 6–8%ig. Maische bei 37° mit Gärflüssigkeit aus einer vorangehenden Charge geimpft (die Impfkulturen sollen in voller Gärung sein, aber noch keine größeren Mengen Aceton und Butanol bilden); in großen, geschlossenen Gärbottichen (mit je etwa 500 hl Maische (oder auch mehr). Gärungseintritt innerhalb 2–3 Stunden. Gasentwicklung durch Gaszähler kontrolliert (Kriterium für den Gärverlauf). Weitere Kontrolle des Gärverlaufes: Acidität und spezifisches Gewicht (vgl. Übungsbeispiel d). Eine 6%ige Stärkelösung ist nach etwa 40 Stunden vergoren. Butanol-Aceton-Gehalt 2– $2\frac{1}{2}$ %. Destillation der Maische in den üblichen Kolonnenapparaten; erstes Destillat etwa 50%ig an Gärprodukten. Trennung durch drei weitere Destillationen (vgl. oben). Gewinnung der durch das Gas mitgerissenen Anteile (10 g pro 1 cbm Gas): Adsorption an aktivierter Holzkohle und Freilegung durch Dampf. Ausbeuten: aus 100 kg Stärke etwa: 22,5 kg Butanol, 11 kg Aceton, 2,7 kg Nebenprodukte (insbesondere Äthanol, aber auch Isopropylalkohol und Methyl-Äthyl-Keton); 100 Teile des Endproduktes bestehen aus 60% Butanol, 30,5% Aceton, 7,5% Nebenprodukten; gleichzeitig entwickeln sich 36 cbm CO_2 und 24 cbm H_2 (gemessen bei Gärtemperatur).

¹ A. J. MANTEUFEL und W. J. ANTYSCHewa: Mikrobiologija 6, 903 (1937).

² DRP. 659 389 (1938). — C. 1938, II, 2198.

³ Norw. P. 59 613 (1938). — C. 1938, II, 2857.

30. Übung:

Die Buttersäuregärung.

a) **Analytischer Gärversuch.** 100 ccm 10%ige sterile Kornschrotmaische nach Zusatz von 5 g CaCO_3 mit 10 ccm einer gärkräftigen Maischekultur des *Bac. butylicus*, geimpft, nach dem Sättigen mit CO_2 mit einem Hg-Gäraufsatz verschlossen; bis zum Aufhören der Gasentwicklung bei 40° gären gelassen. Bestimmung der Gärprodukte wie in Übung 29b; und zwar vom Destillat A (100 ccm) 20 ccm für die Butanol-Äthanolbestimmung (mit nur 5 ccm Oxydationslösung), sonstige Bestimmungen eventuell nach qualitativen Prüfungen vernachlässigen. Vom Destillat B (durch erschöpfende Destillation erhalten, etwa 250 ccm) wird eine Probe titriert (ergibt Gesamtsäure).

Identifizierung der Säuren. Destillat B wird genau mit Natronlauge neutralisiert, auf etwa 30 ccm eingedampft und mit je 10 ccm einer 10%igen Silbernitratlösung fraktioniert gefällt (etwa fünf Fraktionen, jeweils abgesaugt, Filtrat weiter gefällt); zuerst fällt buttersaures Silber, zum Schluß essigsäures Silber. Infolge Anwesenheit von Ameisensäure tritt schließlich meist Schwärzung der Ag-Niederschläge ein. Reinigung der Fraktionen: In etwas Wasser lösen, 1—2 Stunden unter Rückfluß kochen, filtrieren, Filtrat eventuell einengen; Krystallisation der reinen Salze. Schließlich werden die Anteile getrocknet und gewogen. Von der ersten und letzten Fraktion Ag-Bestimmungen. Ag-Butyrat enthält 55,37% Ag, Silberacetat 64,67% Ag.

Bestimmung der Milchsäure (im Rückstand nach dem Abdestillieren der flüchtigen Säuren) wie in Übung 22 a (S. 160).

b) **Präparativer Gärversuch.** 600 g Kornschrot mit 6 l Wasser eingemaischt, im Autoklaven sterilisiert, bei 40° in die Gärapparatur (wie in Übung 22 b) eingefüllt, Zusatz von 300 g steriler Schlammkreide, Impfung mit 500 ccm einer in kräftiger Gärung befindlichen Mischkultur der Buttersäurebakterien (gewonnen aus Heuaufguß) auf dem gleichen Nährboden; täglich wird des öfteren das CaCO_3 kräftig aufgerührt. Gärung nach 10 bis 12 Tagen beendet. Etwa alle 2 Tage Entnahme von 20 ccm Probe und Bestimmung des Ca-Gehaltes im Filtrat (gegen Ende der Gärung Prüfung auf Stärke sowie Reduktionsvermögen). Bei Gärungsabbruch 100 ccm zur Bestimmung der einzelnen Gärungsprodukte wie in Übung 29 b entnehmen.

Aufarbeitung. Ausgegorene Maische mit etwas Calciumhydroxyd bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und unter Benutzung einer WIDMER-Kolonnen 1000 ccm abdestilliert. Rück-

stand filtriert und im Vakuum stark eingeengt. Krystallisation des Ca-Butyrates in der Hitze; aufgekocht und abgesaugt, mit etwas heißem Wasser nachgewaschen. Mutterlauge enthält neben Resten von Ca-Butyrat die Ca-Salze anderer Säuren; mit Soda das Ca vollständig als CaCO_3 ausgefällt, Filtrat mit 50%iger Schwefelsäure angesäuert und mit Äther erschöpfend extrahiert. Extrakt mit geglühtem Glaubersalz getrocknet, Äther abdestilliert, Rückstand fraktioniert destilliert. Falls man die höheren Fettsäuren gewinnen will, werden die aus einer Anzahl gleichartiger Versuche in analoger Weise erhaltenen Rückstände vereinigt. Aus 4 kg Glucose erhielten NEUBERG und ARINSTEIN¹ 35 g höhere Fettsäuren (Capron-, Capryl-, Caprinsäure).

Anhang: Technologie der Buttersäuregärung.

Ausgangsmaterialien und Maischebereitung. Billige Stärkesorten (Kartoffel, Reis, Mais, minderwertiges Mehl u. a. Materialien²) sowie Melasse. Stärke durch Erhitzen mit Wasser auf 100° verkleistert und wie bei der Spiritusbereitung mit Malz bei 57–60° verzuckert (Konzentration der Lösung entsprechend 10% Stärke); besonders bei der Vergärung von Melasse setzt man noch N-haltige Nährstoffe zu (Auszüge aus Kleie, Malzschrot, Pepton; auch anorganische Salze). Zusatz von 50–60% Schlämmkreide (bezogen auf Stärke oder Zucker).

Bakterien. Bei Anwendung einheitlicher Bakterien-Reinkulturen findet meist nur träge, bald aufgehörnde Gärung statt. Bei spontaner Vergärung sind die Ausbeuten schwankend; daher Verwendung natürlicher Reinzuchten, d. h. Anreicherungen von Bakterienmischungen, die durch wiederholtes Überimpfen besonders widerstandsfähig und wirksam gemacht werden.

Gärprozeß und Gärprodukte. Man benützt große hölzerne Bottiche die mit Rührwerk versehen sind, Temperatur 35–40°. Täglich wird mehrmals die Schlämmkreide aufgerührt; Entweichen von CO_2 und H_2 . Ende der Gärung nach 8–10 Tagen. Gärprodukte: Neben Buttersäure (etwa 35% der Stärke) entsteht stets Milchsäure und je nach der Art der Bakterien und Maische wechselnde Mengen Essigsäure, Propionsäure, Valeriansäure, Capronsäure, Bernsteinsäure, Äthanol, Butanol, Amylalkohol usw.

Gewinnung der Buttersäure. Die vergorene Maische wird filtriert und im Vakuum eingeengt; Abscheidung von Ca-Butyrat; Isolierung und Trocknung; mit der berechneten Menge Schwefelsäure (66° Bé) umgesetzt, Rohbuttersäure im Vakuum abdestilliert und durch Fraktionieren gereinigt (Umsetzung des Ca-Butyrates kann auch mit konzentrierter HCl erfolgen; die Buttersäure schwimmt dann als Öl auf der CaCl_2 -Lauge und ist mit kleinen HCl-Mengen verunreinigt, Destillation über Na-Butyrat). Herstellung chemisch-reiner Buttersäure über das Ca-Salz (aus der Fraktion Kp. 160–165°). Reinigung und Zerlegung desselben; oder über den Äthylester, Fraktionierung und Verseifung.

¹ Vgl. NEUBERG und ARINSTEIN: Biochem. Z. 117, 269 (1921).

² So wurde z. B. auch die Schlempe der Butanolgärung als Material für die Buttersäuregärung vorgeschlagen: E. P. 489170 (1938). — C. 1938, II, 2857.

31. Übung:

Zwischenprodukte der Butylgärungen.

a) Festlegung von Buttersäure und Essigsäure bei der Butanol-Aceton-Gärung. 100 ccm 6%ige Kornschrotmaische ebenso wie in Übung 29 b, aber mit 3 g CaCO_3 nach dem Sterilisieren mit 2 ccm einer gärkräftigen Kultur von *Clostr. acetobutylicum* oder *Clostr. butylicum* (u. a.) geimpft; bis zum Aufhören der Gärung bei 37° belassen. Bestimmung der Gärprodukte wie in Übung 29 b und zwar:

Butanol-Äthanol-Bestimmung mit 10—15 ccm Destillat A, Acetonbestimmung mit 20—30 ccm, Acetoinbestimmung mit 20—30 ccm Destillat A.

Buttersäure-Essigsäure-Bestimmung (Destillat B 250 ccm): Gesamtacidität in 10 ccm bestimmt, 50 ccm auf 200 ccm verdünnt und Halbdistillation in üblicher Weise durchgeführt.

Milchsäurebestimmung (im Rückstand der Säuredestillation) wie in Übung 22 a.

In Gegenwart von CaCO_3 ist die Gesamtmenge der Butylprodukte (Buttersäure und Butanol) erheblich größer als in Abwesenheit desselben; hinsichtlich der „Acetonprodukte“ (Aceton, Essigsäure, Äthanol, Acetoin) ergibt sich ein umgekehrtes Verhalten¹.

b) Umwandlung von Buttersäure in Butanol. Acht Ansätze mit je 50 ccm 6%iger Kornschrotmaische in passenden Kolben mit Gärverschluß in üblicher Weise vorbereitet und geimpft. Nach dem kräftigen Angären (etwa nach 24—36 Stunden) wird zu vier Kolben je 1 ccm n-Buttersäurelösung (je 88 mg) zugesetzt, zu den anderen vier Kolben je 1 ccm Wasser. Nach der Beendigung der Gärung werden jeweils die vier Parallelversuche vereinigt (zur Ermittlung der Durchschnittswerte) und auf 500 ccm aufgefüllt. 100 ccm entnommen und wie in Übung 29 b genau durchanalysiert. Werte auf Glucoseäquivalente umgerechnet. Ein Vergleich der mit und ohne Buttersäurezusatz gewonnenen Ergebnisse zeigt die Umwandlung der Buttersäure in Butanol an (meist 80—90%).

c) Abfangung von Acetaldehyd bei der Buttersäuregärung². In einem 5 l-Kolben werden 100 g technische Glucose, 40 g CaCO_3 , 4 g Pepton, 4 g K_2HPO_4 und 1,2 g MgSO_4 in 3 l Leitungswasser sterilisiert und sodann mit 1 l einer 20%igen Lösung von kristallisiertem Natriumsulfit versetzt. Nach dem Impfen mit 40 ccm einer gärkräftigen Reinkultur des *Bac. butylicus* Fitz wird bei

¹ Vgl. BERNHAUER, IGLAUER, GROAG und KÖTTIG: *Biochem. Z.* 287, 61 (1936).

² Vgl. NEUBERG und ARINSTEIN: *Biochem. Z.* 117, 269 (1921).

36—38° gären gelassen. Nach etwa 2 Tagen wird Bakterienwachstum sichtbar. Nach 10—20 Tagen wird der Versuch aufgearbeitet. Zugleich wird ein Parallelversuch, aber ohne Zusatz von Sulfid durchgeführt.

Bestimmung des noch unverbrauchten Zuckers und des Acetaldehyds vgl. S. 119; ferner des entstandenen Alkohols durch Destillation eines aliquoten Teiles des noch unveränderten Gärgutes; in einem anderen Teil des Destillates bestimmt man den Acetaldehydgehalt und sodann die Summe von Acetaldehyd und Alkohol nach der Oxydationsmethode und Titration der entstandenen Essigsäure (vgl. S. 112 und 189). Vom Gesamtwert wird dann der dem Acetaldehyd entsprechende Wert abgezogen. Bestimmung der entstandenen Essigsäure nach dem Entfernen der flüchtigen neutralen Anteile und des Sulfits (Oxydation zu Sulfat) durch Destillation des angesäuerten Rückstandes und Titration des Destillates.

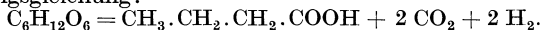
Während bei der normalen Vergärung hauptsächlich Buttersäure entsteht, wird bei der Sulfitgärung viel Essigsäure (etwa 20%) und Alkohol (etwa 13%) neben dem abgefangenen Acetaldehyd gebildet (etwa 7—8%, alle Zahlen beziehen sich auf verbrauchten Zucker).

Anhang: Typen und Chemismus der Butylgärungen.

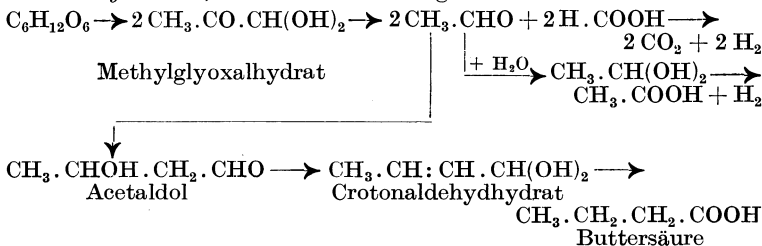
Vorläufige Unterscheidung von zwei Gärungstypen: Buttersäuregärung (die entweder als reine Buttersäuregärung, oder als Buttersäure-Essigsäure-Gärung oder als Buttersäure-Propionsäure-Gärung auftritt) und Butanolgärung (die als Butanol-Aceton-Gärung, als Butanol-Isopropanol-Gärung, als Butanol-Äthanol-Gärung und in anderen Formen auftritt, je nach der Art der Gärungserreger).

1. Buttersäuregärung. Für den Chemismus ist charakteristisch die Annahme einer Aldolkondensation von zwei Molekülen Acetaldehyd oder Brenztraubensäure und Umlagerung des Aldolisierungsproduktes in Buttersäure.

Gärungsgleichung:



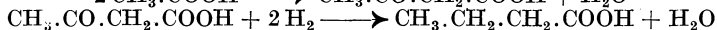
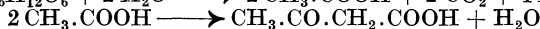
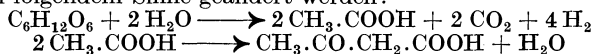
Gärungsschema, in Übereinstimmung mit Bilanzversuchen¹:



¹ DONKER: Diss. Delft 1926. — Vgl. auch KLUYVER und DONKER: Chem. Zelle 13, 134 (1926).

Das Schema ist im wesentlichen hypothetischer Natur; die Bildung von Acetaldehyd könnte nämlich auch über Brenztraubensäure führen; die Bildung und Umwandlung des Acetaldots ist unbewiesen¹; vgl. auch den Weg über Brenztraubensäurealdol (siehe Tab. XIX)². Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang auch die Bildung höherer Fettsäuren (Capron-, Caprin- und Caprylsäure) bei der Buttersäuregärung aus Glucose (vgl. auch S. 197) sowie die Bildung sehr erheblicher Mengen Capronsäure neben Buttersäure und Essigsäure bei der Einwirkung von Methanbakterien auf Äthylalkohol, wobei der Weg über Acetaldehyd sehr naheliegend erscheint (vgl. S. 214). Von Interesse ist ferner die Umschaltung der Buttersäuregärung in Milchsäuregärung in Gegenwart von CO, wobei die Milchsäure als Hauptgärungsprodukt entsteht³.

Nach neueren Anschauungen⁴ könnte die Bildung der Buttersäure auch über Acetessigsäure erfolgen, das obige Gärungsschema mußte dann in folgendem Sinne geändert werden:



Umwandlung von β -Oxybuttersäure in Buttersäure konnte allerdings nicht beobachtet werden. Bildung und Umwandlung von Zwischenprodukten (vgl. Tab. XIX).

Tabelle XIX.

Mögliche Zwischenprodukte	Bildung, Abfangung und Anhäufung derselben	Umwandlung derselben
Milchsäure	etwa 10% bei der Glucosevergärung ⁵ , in Gegenwart von CO als Hauptprodukt ³	—
Brenztraubensäure	—	in Essigsäure und Ameisensäure ⁶ , in Essigsäure und Buttersäure ⁴
Acetaldehyd	Abfangung bei der Sulfidgärung (bis etwa 16% d. Th.) ⁶	—
Brenztraubensäurealdol	—	in Buttersäure ⁶

¹ JANKE und SIEDLER: Bio. Z. 292, 101 (1937) beobachteten lediglich Bildung von 0,8% Buttersäure bezogen auf Acetaldots unter der Einwirkung einer Bakteriensuspension (innerhalb 24 Tagen).

² In diesem Zusammenhang erscheinen auch die neuen Befunde von MEYERHOF, LOHMANN und SCHUSTER [Biochem. Z. 286, 297 (1936)] über die fermentative Aldolkondensation von Dioxyacetonphosphorsäure mit Acetaldehyd unter der Einwirkung der Aldolase von großem Interesse, da vielleicht ähnliche Vorgänge auch bei der Bildung einer Vorstufe der Buttersäure in Frage kommen könnten.

³ KUBOWITZ: Biochem. Z. 264, 285 (1934).

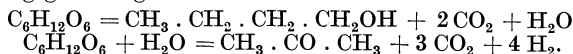
⁴ LANGLYKKE, PETERSON und FRED: J. Bact. 34, 443 (1937).

⁵ BUCHNER und MEISENHEIMER: B. 41, 1410 (1908).

⁶ NEUBERG und ARINSTEIN: Biochem. Z. 117, 269 (1921).

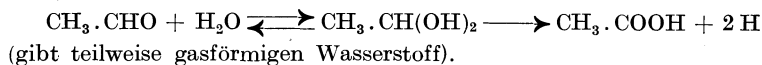
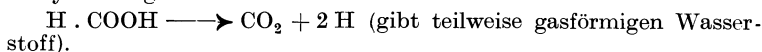
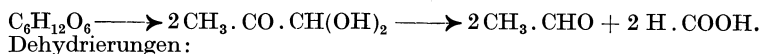
2. Butanol-Aceton-Gärung. Chemismus in enger Anlehnung an den der Buttersäuregärung. Buttersäure und Essigsäure als Zwischenprodukte im Medium auftretend. Besonders bemerkenswert als biochemische Reaktion ist die Hydrierung der Buttersäure zu Butanol (verläuft wohl über Butyraldehyd, vgl. unten).

Gärungsgleichungen:

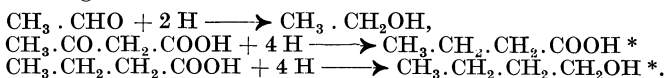


Vergärung von Pentosen ergibt bemerkenswerterweise, daß das Verhältnis der Gärprodukte annähernd das gleiche ist, wie bei der Hexosenvergärung. Erklärung durch die Annahme, daß der als Spaltungsprodukt vermutlich auftretende Glykolaldehyd nicht zu Essigsäure abgebaut, sondern zur Synthese von C₆-Kohlehydraten verwendet wird¹. Dagegen haben andere Autoren ein abweichendes Verhältnis der Gärprodukte festgestellt².

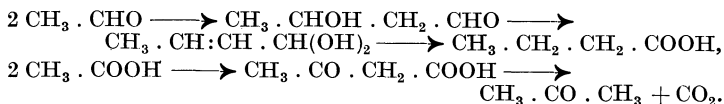
Gärungsschema, in Übereinstimmung mit Bilanzversuchen³. Primärer Zerfall:



Hydrierungen:



Kondensationen:



Es läßt sich vorläufig noch nicht entscheiden, welcher der beiden mit * bezeichneten Prozesse den Tatsachen entspricht. Der Weg über Acetessigsäure ergäbe eine leichte Erklärung für das gemeinsame Auftreten von Butanol und Aceton. Eine gekoppelte Entstehung der beiden Produkte soll allerdings nicht in Frage kommen⁴. Enzymchemische Versuche ergaben noch keine Klärung, doch gelang es, zu beweisen, daß Fettsäuren zu Alkoholen durch ein Fermentsystem reduziert werden⁵.

¹ VAN DER LEK: Diss. Delft 1930.

² L. A. UNDERKOFER und J. E. HUNTER: In. Eng. Chem. **30**, 480 (1938).

³ DONKER: Diss. Delft 1926; vgl. auch VAN DER LEK: Diss. Delft 1930; KLUYVER: Erg. d. Enzymforschung **4**, 264 (1935).

⁴ JANKE und SIEDLER, l. c.

⁵ E. SIMON und CH. WEIZMANN: Enzymologia **4**, 169 (1937).

Bildung und Umwandlung von Zwischenprodukten (vgl. Tab. XX).

Tabelle XX.

Mögliche Zwischenprodukte	Bildung, Abfangung u. Anhäufung derselben	Umwandlung derselben
Methylglyoxal	durch Einwirkung von Bakterienpräparaten auf Hexosediphosphat ¹	hemmt bereits in Konzentrationen von 0,03% die Gärung ²
Milchsäure	Isolierung geringer Mengen ³	Verschiebung des Verhältnisses Butanol: Aceton auf 84:16 (sonst 67:33) ⁴
Brenztraubensäure	—	in Essigsäure, Aceton, Acetylmethylcarbinol und Butylprodukte ^{2, 5}
Acetaldehyd	—	durch aktive Bakterien bis über 60% in Butanol, durch weniger aktive zu 10–21% in Butylprodukte, Rest besonders in Äthanol ⁶ . Zu über 10% in Butylprodukte ⁷
Essigsäure	vgl. Acetongärung	vgl. Acetongärung
Acetaldol	—	entweder giftig ⁸ , od. ohne Giftwirkung (0,088 bis 0,176%), aber keine Umwandlung in Gärprodukte ⁶ , zu etwa 10% in Äthanol und Essigsäure ⁹

¹ PETT und WYNNE: J. of biol. Chem. **97**, 177 (1932); im Prinzip gemäß dem NEUBERGSchen Verfahren.

² JOHNSON, PETERSON und FRED: J. of biol. Chem. **101**, 145 (1933).

³ SPEAKMAN: J. of biol. Chem. **58**, 395 (1923).

⁴ Soc. RICARD ALLENET & Cie, Melle: C. **1925**, II, 761.

⁵ BERNHAUER, IGLAUER, GROAG und KÖTTIG: Biochem. Z. **287**, 61 (1936).

⁶ BERNHAUER und KÜRSCHNER: Biochem. Z. **280**, 379 (1935).

⁷ Unter der Einwirkung von Bakteriensuspensionen; zugleich werden über 42% in Äthanol und Essigsäure umgewandelt (etwa in äquimolarem Verhältnis). Vgl. JANKE und SIEDLER, l. c.

⁸ JOHNSON, PETERSON und FRED: J. of biol. Chem. **101**, 145 (1933).

⁹ Mittels Bakteriensuspension (allerdings erst nach 24 Tagen), JANKE und SIEDLER, l. c.

Tabelle XX (Fortsetzung).

Mögliche Zwischenprodukte	Bildung, Abfangung u. Anhäufung derselben	Umwandlung derselben
Crotonaldehyd	—	hemmt in Konzentrationen von 0,036% sofort die Gärung ¹
β -Oxybuttersäure	nicht auffindbar ²	ungiftig, aber keine Umwandlung in Gärprodukte ^{2, 1}
Crotonsäure	—	in Butanol und Aceton in wechselndem Mengenverhältnis ¹
Buttersäure	Anstieg u. Abfall bei d. normalen Gärung ^{3, 4} , erhebliche Mengen mit CaCO_3 ^{5, 6}	zu etwa 80% in Butanol, zu 10% in Aceton ⁷ , über 95% in Butanol ¹
Butyraldehyd	—	über 95% in Butanol (manchmal auch teilweise in Aceton) ¹

3. Butanol-Isopropanol-Gärung. Gärungserreger: Clostridium felsineum⁸ und verschiedene Stämme von Butylbakterien⁹. Gärungsvorgang noch wenig untersucht. Bei manchen Kulturen bildet sich neben Butanol und Isopropylalkohol nur wenig Aceton, bei anderen entstehen die letztgenannten Produkte in etwa gleicher Menge, bei anderen wieder findet sich überhaupt kein Isopropylalkohol (vgl. unter 2). Wieder andere Bakterienstämme bilden Isopropanol wohl aus Arabinose, nicht aber aus Glucose⁹.

Chemismus: Der Isopropylalkohol entsteht zweifellos durch Reduktion von Aceton¹⁰; bei höheren Ausbeuten an Isopropylalkohol ist die Menge an Butanol geringer, da dann für diesen Vorgang nicht genug Wasserstoff zur Verfügung steht. Bei diesem Gärprozeß

¹ BERNHAUER und KÜRSCHNER: Biochem. Z. **280**, 379 (1935).

² JOHNSON, PETERSON und FRED: J. of biol. Chem. **101**, 145 (1933).

³ SPEKMANN: J. of biol. Chem. **58**, 395 (1923).

⁴ Vgl. auch REILLY, HICKINBOTTOM, HENLEY und THAYSEN: Biochemic. J. **14**, 229 (1920).

⁵ Vgl. z. B. REILLY und HICKINBOTTOM: Chem. Trade J. **65**, 331 (1919); STILES, PETERSON und FRED: J. of biol. Chem. **84**, 437 (1929).

⁶ BERNHAUER, IGLAUER, GROAG und KÖTTIG: Biochem. Z. **287**, 61 (1936).

⁷ SPEAKMAN: J. of biol. Chem. **41**, 319 (1920).

⁸ VAN DER LEK: Diss. Delft (1930).

⁹ Vgl. LANGLYKKE, PETERSON und Mc COY: J. Bacter. **29**, 333 (1935).

¹⁰ LANGLYKKE, PETERSON u. FRED: J. Bacter. **34**, 443 (1937).

konnten Methylglyoxal, Brenztraubensäure und Milchsäure erhalten werden. In Gegenwart von Natriumbicarbonat werden Säuren angehäuft¹.

4. Butanol-Äthanol-Gärung. Diese Gärungsform findet sich bei manchen Stämmen der Butanol-Aceton-Bakterien stärker ausgeprägt, indem von diesen nur sehr wenig Aceton erzeugt wird, wogegen relativ größere Mengen Äthanol auftreten². Bekanntlich findet sich auch bei der gewöhnlichen Butanol-Aceton-Gärung unter den Neutralprodukten stets eine gewisse Menge Äthanol. Es sind daher — je nach der Art der verwendeten Bakterien — die verschiedensten Übergangsformen bei der Bildung der Gärprodukte verwirklicht.

32. Übung:

Die Äthanol-Aceton-Gärung.

a) Analytischer Gärversuch. Genau so durchzuführen, wie Übung 29 b; Impfung mit gärkräftiger Kultur von *B. acetoäthylicus* oder *B. macerans*. Gärverlauf träger als bei der Butanol-Aceton-Gärung; Gärdauer etwa 6—8 Tage. Analysengang prinzipiell analog (Trennung der sauren und nichtsauren Bestandteile).

Bestimmung von Aceton und Acetylmethylcarbinol (im Destillat A) ganz analog.

Bestimmung von Äthanol durch Oxydation zu Essigsäure, vgl. S. 112.

Bestimmung von Essigsäure und Ameisensäure: Nach Entfernung der neutralen flüchtigen Anteile wird der Rückstand angesäuert und mit Wasserdampf destilliert (Destillat B); Titration ergibt die Gesamtsäuren. Ameisensäure wird an einem aliquoten Teil gesondert bestimmt (vgl. S. 180). Die Differenz gegenüber der Gesamtsäure ergibt die Menge an Essigsäure.

b) Präparativer Gärversuch (unter analytischer Kontrolle des Gärverlaufes). Ebenso wie in Übung 29 d, mit *B. acetoäthylicus* oder *B. macerans*. Zusatz von 10% Schlämmkreide (bezogen auf den Stärkegehalt). Gärtemperatur 40—42°; Einsetzen der Gärung nach 1½—2 Tagen. Gärdauer 6—8 Tage. Täglich des öfteren kräftig Umschütteln bzw. Rühren.

Analytische Kontrolle des Gärverlaufes: Entnahme von 100 ccm des Gärgutes etwa alle 16—24 Stunden und wie in a analysieren.

Technische Kontrolle des Gärverlaufes. Probeentnahme in den gleichen Zeitintervallen wie zuvor; 10 ccm direkt titriert, 40 ccm filtriert und spezifisches Gewicht festgestellt.

¹ O. L. OSBURN, R. W. BROWN und C. H. WERKMAN: J. biol. Chem. **121**, 685 (1937).

² Vgl. LANGLYKKE, PETERSON und MC COY: J. Bacter. **29**, 333 (1935).

Präparative Aufarbeitung. Destillation wie in Übung 29d. Etwa 2 l Destillat aufgefangen. Trennung von Aceton und Äthanol durch weitere Destillationen. Kp. des Acetons 56°, des Äthanol 78°.

Anhang: Technologie der Äthanol-Aceton-Gärung.

Ausgangsmaterialien und Maischebereitung. Am besten Mais oder Reis, ferner auch gesunde Kartoffeln, Futterrüben, Zuckerrüben, bestimmte Melassesorten usw. Reinigung und Zerkleinerung des Materials, Herstellung der Maische, Zusatz von 10% Schlämmkreide (bezogen auf den Stärke- oder Zuckergehalt), mit Wasser auf das 15–20fache des Stärkegehaltes verdünnt, Sterilisation durch zweistündiges Erhitzen unter 2 Atm. Druck (Stärkelösung 5–6,6%ig).

Durchführung der Gärung. Verwendung eines Gärkessels mit Rührwerk. Maische (unter Zutritt steriler Luft) auf 41° abkühlen gelassen. Impfung mit einer erheblichen Menge einer kräftig gärenden Kultur (Züchtung der Bakterien nach einem besonderen Verfahren); alle 2 Stunden wird gerührt. Gärtemperatur 40–42°. Gärdauer 5–7 Tage. Waschung der Gase, um mitgerissenes Aceton und Alkohol festzuhalten.

Gewinnung der Gärprodukte. Destillation in einem gewöhnlichen Brennereiapparat. Trennung des Alkohol-Aceton-Gemisches in einem Rektifizierapparat mit hoher Kolonne. Nebenprodukte: Kleine Mengen Essigsäure und Ameisensäure (durch die Kreide gebunden; bleiben im Rückstand).

Ausbeute etwa 36–40% der verarbeitenden Stärke. 100 kg Mais geben 20 l Alkohol, 10 l Aceton, 22 cbm CO₂ und 16 cbm H₂ (Schlempe als Viehfutter verwendbar; Herstellungskosten etwa wie in der Spiritusbrennerei).

33. Übung:

Zwischenprodukte der Acetongärung.

a) **Vergärung der Essigsäure zu Aceton.** Grundsätzlich genau so wie in Übung 31b durchzuführen, nur daß an Stelle von Buttersäure Essigsäure verwendet wird. Der Vergleich der mit und ohne Essigsäurezusatz durchgeführten Versuche zeigt den Anstieg im Acetonwert bei den Versuchen mit Essigsäurezusatz an.

b) **Decarboxylierung der Acetessigsäure¹.** Durchführung des Versuches grundsätzlich wie in Übungsbeispiel 31b. Nach dem Angären setzt man zu je vier Kolben je 1 ccm einer n-Lösung von acetessigsäurem Natrium (also je 92 mg Acetessigsäure), zu den anderen vier Parallelversuchen je 1 ccm Wasser. Außerdem stellt man eine Probe Acetessigsäure in der gleichen Konzentration wie im Versuch auf, um den Grad der Selbstzersetzung der Acetessigsäure festzustellen. Man läßt dann alle Kolben bei 24°

¹ Vgl. JOHNSON, PETERSON und FRED: J. of biol. Chem. 101, 145 (1933).

4—6 Stunden stehen, vereinigt dann die zueinander gehörigen Kolben und bestimmt den Gehalt an noch vorhandener Acetessigsäure sowie an entstandenem Aceton in den Versuchen.

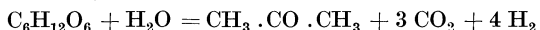
Bestimmung der Acetessigsäure. 10—50 ccm Probe werden mit Natriumchlorid gesättigt und nach Zusatz einiger Tropfen Paraffinöl unter Durchleitung eines starken Luftstromes (z. B. in einer Saugprouvette, die mit einem Einleitungsrohr versehen und an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen wird) vom Aceton befreit. Nach 1 Stunde wird die Probe mit Wasserdampf destilliert, wobei die Acetessigsäure unter Bildung von Aceton zersetzt wird. Im Destillat bestimmt man das Aceton in üblicher Weise (vgl. S. 190).

Eine zweite Probe des Kulturmediums wird direkt mit Wasserdampf destilliert und im Destillat das Aceton bestimmt. Man erhält so die Gesamtmenge an Aceton (ursprünglich vorhandene Menge und aus der Acetessigsäure entstandene Menge). Durch entsprechende Subtraktion ergibt sich die Menge des ursprünglich vorhandenen Acetons.

Anhang: Chemismus der Acetongärung.

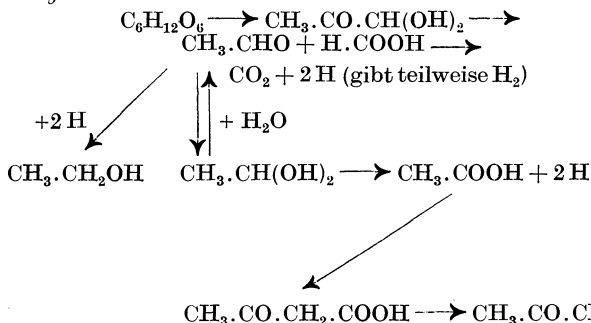
Charakteristisch für den Chemismus ist die Kondensation zweier Moleküle Essigsäure zu Acetessigsäure und die Decarboxylierung dieser.

Gärungsgleichung:



Die theoretische Ausbeute an Aceton beträgt daher 32,2%; neben der Acetongärung geht jedoch stets, und zwar in überwiegendem Ausmaße eine alkoholische Gärung vor sich. Spaltungsvorgänge nach dem Ameisensäureschema (KLUYVER).

Gärungsschema



Bildung und Umwandlung von Zwischenprodukten (vgl. Tab. XXI).

Tabelle XXI.

Mögliche Zwischenprodukte	Bildung, Abfangung und Anhäufung derselben	Umwandlung derselben
Brenztraubensäure	mittels wenig aktiver Bakterien wahrscheinlich gemacht ¹	—
Acetaldehyd	bei der Sulfitgärung ²	in Aceton und Äthanol ² nach anderen Autoren keine Umwandlung ³
Essigsäure	Anstieg und Abfall bei der Butanol-Aceton-Gärung ⁴ ; erhebliche Mengen mit CaCO ₃ ⁵	quantitativ in Aceton und CO ₂ bei der Äthanol-Acetongärung ² , auch bei der Butanol-Aceton-Gärung ⁶ , bis zu 97% ⁷ ; Bakteriensuspension ergibt kein Aceton ⁸
Acetaldol	—	in Aceton ²
β-Oxybuttersäure	bei der Butanol-Aceton-Gärung nicht aufgefunden ⁹	ungiftig, aber nicht umwandelbar ⁹ , ⁷
Crotonsäure *	—	in Aceton und Butanol in wechselnden Mengen ⁷
Buttersäure *	in Gegenwart von CaCO ₃	zum Teil auch in Aceton ¹⁰ , ⁷
Butyraldehyd *	—	bis zu 25% in Aceton ⁷
Acetessigsäure *	—	in Aceton, auch durch Bakterienpräparate ⁹

* Bei der Butanol-Aceton-Gärung.

¹ SPEAKMAN: J. of. biol. Chem. **64**, 41 (1925). — ² BAKONYI: Biochem. Z. **169**, 125 (1926). — ³ Vgl. auch Butanolgärung. — ⁴ Vgl. z. B. REILLY, HICKINBOTTOM, HENLEY und THAYSEN: Biochemic. J. **14**, 229 (1920); SPEAKMAN: J. of. biol. Chem. **58**, 395 (1923). — ⁵ Vgl. z. B. REILLY und HICKINBOTTOM: Chem. Trade J. **65**, 331 (1919); — STILES, PETERSON und FRED: J. of. biol. Chem. **84**, 437 (1929). — ⁶ REILLY, HICKINBOTTOM, HENLEY und THAYSEN: Biochemic. J. **14**, 229 (1920). — Vgl. auch SPEAKMAN: J. of. biol. Chem. **41**, 319 (1920). — ⁷ BERNHAUER und KÜRSCHNER: Biochem. Z. **280**, 379 (1935). — ⁸ JANKE und SIEDLER: Bio. Z. **292**, 101 (1937). — ⁹ JOHNSON, PETERSON und FRED: J. of. biol. Chem. **101**, 145 (1933). — ¹⁰ SPEAKMAN: J. of. biol. Chem. **41**, 319 (1920).

Erreger der Äthanol-Aceton-Gärung sind insbesondere Organismen der *Aerobacillus*-Gruppe, wie *B. macerans*¹ oder *B. acetooethylicus*².

Einen zweiten *Typus* der *Aerobacillus*-Gruppe stellen die *Erreger der Äthanol-Butylenglykalgärung* vor: *B. polymyxa*³, *Aerobacter pectinovorum*⁴ und ähnliche Organismen⁵. Neben Alkohol und Butylenglykol entstehen vielfach auch Acetoin und Aceton, CO₂ und H₂, ferner Essigsäure und Ameisensäure, sowie schließlich auch kleine Mengen Milchsäure und Bernsteinsäure. Als Intermediärprodukt wurde Acetaldehyd nachgewiesen⁶. Die Ausbeute an 2,3-Butylenglykol kann bis auf 30% ansteigen⁴. Der Chemismus des Prozesses dürfte der gleiche sein wie bei der Aerogenesgärung (vgl. S.184).

Es sei noch darauf hingewiesen, daß auch bei der Butanol-Aceton-Gärung vielfach Acetoin gebildet wird, das die Muttersubstanz des 2,3-Butylenglykols vorstellt.

Übersicht der bei den Butyl- und Acetongärungen stattfindenden Prozesse.

Es sind daher bei den Butanol-Aceton-Gärungen drei verschiedene *Kondensationsprozesse* anzunehmen, nämlich:

1. Aldolkondensation des Acetaldehyds bzw. der Brenztraubensäure oder anderer Zwischenprodukte (Dioxyacetonphosphorsäure + Acetaldehyd, vgl. S. 134); dies könnte ein Weg zur Bildung von Buttersäure sein. Endgültige Beweise liegen allerdings noch nicht vor.

2. Acyloinkondensation des Acetaldehyds, unter Bildung von Methylacetylcarbinol⁷.

3. Kondensation von Essigsäure, unter Bildung von Acetessigsäure und Decarboxylierung dieser unter Bildung von Aceton. Ferner könnte durch Reduktion von Acetessigsäure Buttersäure entstehen.

Andrerseits finden wir folgende *Reduktionsprozesse* verwirklicht:

1. Reduktion von Carboxylgruppen: Bildung von Butanol aus Buttersäure und Bildung von Äthanol aus Essigsäure (auch bei anderen Säuren verwirklicht: z. B. Bildung von Propylalkohol aus Propionsäure⁸).

2. Reduktion von Ketogruppen: Bildung von Isopropylalkohol aus Aceton, Bildung von 2,3-Butylenglykol aus Acetoin. Ferner erscheint die Bildung von Buttersäure aus Acetessigsäure möglich.

¹ SCHARDINGER: C. Bacter. II, 14, 772 (1905); 19, 161 (1907).

² NORTHROP, ASHE und SENIOR: J. of biol. Chem. 39, 1 (1919).

³ DONKER: Tijdschr. v. vergel. Genesk. 11, 78 (1925).

⁴ FULMER, CHRISTENSEN und KENDALL: Ind. Chem. 25, 798 (1933). Die Autoren beschreiben ein Verfahren zur Erzeugung von 2,3-Butylenglykol aus Rohrzucker auf gärungstechnischem Weg (vgl. auch Übung 27c).

⁵ LANGLYKKE, PETERSON und Mc COY: J. Bacter. 29, 333 (1935).

⁶ PATRICK: C. 1933, I, 2125.

⁷ Dasselbe zeigt — ebenso wie das durch Hefe entstehende Produkt — l-Drehung YAMASAKI und KARASIMA: Enzymologia 3, 271 (1937).

⁸ BLANCHARD und MAC DONALD: C. 1936, I, 3159, J. of biol. Chem. 110, 145 (1935).

C. Cellulosevergärungen.

34. Übung:

Isolierung cellulosevergärender Thermobakterien.

a) Gewinnung und Anreicherung von Rohkulturen¹. Anwendung folgender Nährlösung: 0,2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0,05% NaCl. Eine größere Anzahl von weiten Proberöhren wird mit 10—20 ccm dieses Nährmediums und zwei bis drei Streifen Filtrierpapier beschickt und nach dem Sterilisieren mit 0,5—1 g frischem Pferdemist verschiedener Herkunft versetzt. Nach 48stündigem Verweilen bei 60° ist in den Röhrchen in der Regel bereits ein deutlicher Cellulosezerfall zu beobachten. Von jenen Proben, bei denen die Cellulosezersetzung am kräftigsten ist, wird nach 3—4 Tagen je ein Streifen Filtrierpapier in ein neues Röhrchen mit dem gleichen Nährmedium und frischen Filtrierpapierstreifen übergeführt. Die so geimpften Röhrchen werden zunächst etwa 5 Minuten auf 100° erhitzt, um eventuell vorhandene, nicht sporenbildende Bakterien abzutöten, und sodann bei 60° aufbewahrt. Der ganze Prozeß wird zwecks Anreicherung der cellulosevergärenden Bakterien des öfteren wiederholt, sobald jeweils die Papierstreifen zu zerfallen beginnen. Bei den späteren Passagen (etwa nach der vierten oder fünften Übertragung) verwendet man das gleiche Nährmedium wie oben, doch unter Zusatz von 0,1—0,2% Pepton. Die so erhaltenen Rohkulturen benutzt man zur weiteren Isolierung bzw. Reinzüchtung der Cellulosevergärer (vgl. unter b) oder auch direkt zur Durchführung von Cellulosevergärungen (vgl. Übung 35).

b) Isolierung von relativen Reinkulturen cellulosevergärender Bakterien² (aus den Rohkulturen in einer Züchtungskammer auf Agarplatten mit Hilfe des Verdünnungsverfahrens). Man verwendet dabei folgendes Cellulosemedium: 0,2% $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01% CaCl_2 , 0,5% Pepton und 3% Cellulose (Filtrierpapier)³ in Leitungswasser

¹ Vgl. SIMOLA: Ann. Ak. Sc. Fennicae A 34, Nr 1 (1931). — SARLES, FRED und PETERSON: C. Bacter. II, 85, 401 (1932).

² Vgl. TETRAULT: J. Bacter. 19, 15 (1930); C. Bacter. II, 81, 28 (1930). — SARLES, FRED und PETERSON: C. Bacter. II, 85, 401 (1932).

³ Die eingewogene Menge Filtrierpapier wird in einer Schale unter Wasser mechanisch fein zerzupft, dann abfiltriert, gewaschen und zugesetzt. — Nach A. ITANO und S. ARAWAKI [Ber. d. Ohara Inst. f. landw. Forsch. 5, 291 (1932)] kann man eine einheitliche, feine Cellulosesuspension in folgender Weise herstellen: Zu 1 l konz. Ammoniaklösung ($d = 0,90$) werden 75 g reines Kupfercarbonat und 250 ccm Wasser zugesetzt und geschüttelt bis alles gelöst ist. Dann werden

($p_H = 6,6 - 6,8$)¹. In diesem Medium wird zunächst eine wie unter a) gewonnene Rohkultur bis zur starken Zersetzung der Cellulose bei 60° zur Entwicklung gebracht. Von einer derartigen Kultur wird dann weiter ausgegangen („Ausgangskultur“ für die Reinzüchtung).

Zur Isolierung der Bakterien benutzt man Züchtungskammern, bestehend aus zwei PETRI-Schalen von gleichem Durchmesser, die durch einen Streifen Leukoplast fest miteinander verbunden werden. Die untere Schale wird mit einer etwa 5 mm hohen Schicht des oben angeführten, aber cellulosefreien Mediums, das 1,5% Agar enthält, beschickt. Diese Agarplatte wird unmittelbar vor dem Zusammensetzen der Züchtungskammer mit einer Öse der Rohkultur („Ausgangskultur“) bestrichen². Die obere Schale dient zur eigentlichen Reinzüchtung der cellulosevergärenden Bakterien. Dieselbe wird mit Celluloseagar (Cellulosemedium mit 0,8% Agar) beschickt, nachdem die verdünnte Impfproube zugesetzt wurde. Dabei geht man folgendermaßen vor: 1 ccm der „Ausgangskultur“ wird mit 10 ccm des Substrates gut vermischt (Verdünnung 1:10), dann 1 ccm dieser verdünnten Probe wieder mit 10 ccm des Nährsubstrates vermischt (Verdünnung 1:100) und so weiter vorgegangen³. Schließlich wird je 1 ccm der so erhaltenen verdünnten Probe (und zwar z. B. von der

15 g Filtrierpapier hinzugefügt und geschüttelt, bis die ursprüngliche Form des Papiers verschwunden ist. Sodann wird auf 5 l verdünnt und Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion hinzugefügt, wobei die Farbe von dunkelblau nach hellgrün umschlägt und die gelöste Cellulose ausfällt. Die erhaltene Lösung wird auf 10 l gebracht, stehen gelassen und dann filtriert. Die Waschung durch Dekantation wird so lange wiederholt, bis die Kupfer- und Chlor-Ionen völlig entfernt sind; schließlich wird die Cellulosesuspension auf 500 ccm aufgefüllt.

— Um einen geeigneten Cellulosenährboden zu erhalten versetzt man noch mit 1 g K_2HPO_4 , 1 g NaCl, 2 g $(NH_4)_2SO_4$, 2 g $CaCO_3$, 10 g Agar und 500 ccm Wasser. Dieses Medium wird abgefüllt und im Autoklav bei 1,5 Atm. Druck während 30 Minuten sterilisiert.

¹ Sterilisierung des Mediums: 1 Stunde im Dampfopf, dann 2 Stunden im Autoklav (bei sofortigem Autoklavieren ballt sich das Filtrierpapier zusammen und wird aus dem Proberohr herausgedrückt).

² In den Rohkulturen sind stets auch andere Organismen vorhanden, die Cellulose nicht zu zersetzen vermögen. Diese Begleitorganismen entwickeln sich auf der unteren Agarplatte und erzeugen in der Kammer eine passende Sauerstofftension für die in der oberen Celluloseplatte befindlichen Organismen.

³ Die Verdünnung kann auch so durchgeführt werden, daß mittels der Platinöse in ein 10 ccm Flüssigkeit enthaltendes Fläschchen eingimpft wird und dann in sinngemäßer Weise weiter vorgegangen wird. Auch hier ist der Verdünnungsgrad festzustellen.

Verdünnung 1:1000 oder 1:100000 usw.) zu dem in einem Proberröhrchen befindlichen warmem Celluloseagar hinzugefügt, gut verteilt und das Ganze in die obere Schale ausgegossen. Nach dem Erstarren des Agars und nachdem auch die unteren Schalen in der oben erwähnten Weise geimpft wurden, werden die Züchtungskammern durch Anlegen eines Leukoplastbandes verschlossen und bei 60° aufbewahrt. Die auf den Platten sich entwickelnden Kolonien werden sodann mikroskopisch untersucht, auf das Cellulosemedium (bzw. auf Celluloseagar) übertragen und weitergezüchtet. Verwendung für die Durchführung von Cellulosevergärungen.

35. Übung:

Vergärung der Cellulose zu Säuren.

a) Gärversuche zur Auswahl geeigneter Kulturen. In einigen Kolben von 500 ccm Inhalt (mit Gärverschluß versehen), werden je 300 ccm des Cellulosemediums (vgl. oben) vorbereitet und je 6 g CaCO_3 zugesetzt. Nach dem Sterilisieren wird mit je 15 ccm (= 5% des Ansatzes) verschiedener Kulturen der cellulosezersetzenden Bakterien in dem gleichen Nährmedium geimpft (z. B. verschiedene Rohkulturen gemäß der Übung 34a oder gereinigte Kulturen gemäß b). Gärtemperatur 60°. Abbruch der Versuche, sobald die Cellulosemenge stark abgenommen hat, bzw. sobald die Gärung nur noch träge verläuft (etwa nach 6 bis 20 Tagen, je nach dem Gärvermögen der Kultur).

Aufarbeitung (nach dem Auffüllen des Gäransatzes auf das ursprüngliche Volumen): Bestimmung der unvergorenen Cellulose: 50 ccm der Suspension werden mit Salzsäure angesäuert und durch einen getrockneten und gewogenen Glassintertiegel filtriert, ausgewaschen, 24 Stunden bei 110° getrocknet und gewogen. Bestimmung des reduzierenden Zuckers und des Ca-Gehaltes in üblicher Weise (vgl. S. 160).

Bestimmung der flüchtigen Säuren (Hauptmenge Essigsäure): 100 ccm des Gärgutes werden mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf destilliert; etwa 1200—1500 ccm Destillat aufgefangen. Probe des Destillates zur Bestimmung der Gesamtacidität mit $n/10$ Lauge titriert (zum Schluß bei Siedetemperatur), 200 ccm der Halbdestillation unterworfen zwecks Bestimmung von Essigsäure und Buttersäure (vgl. Übung 25 b und 29 b). Die gebildeten Gesamtsäuren bestehen meist aus Essigsäure und Buttersäure.

b) Präparativer Versuch. Benutzung der geeignetsten Kultur (gemäß a) für die Durchführung einer kontinuierlichen Gärung. In einem 10 l fassenden, mit Rührwerk versehenen Gärgefäß (vgl. Übung 19b) werden 7,5 l Cellulosemedium (mit 2% Ca CO₃ mit etwa 300 ccm einer 6—10 Tage alten Bakterienkultur im gleichen Medium (vgl. unter a) versetzt und unter zeitweisem Rühren bei 60° stehen gelassen (erster Ansatz). Nach der Vergärung (etwa 12—18 Tage) wird die überstehende Flüssigkeitsschicht abgehebert (etwa 6,5 l) und dann werden wieder 6,5 l frisches Cellulosemedium (mit CaCO₃) eingefüllt (zweiter Ansatz); dieser Vorgang wird nach der Vergärung nochmals wiederholt (dritter Ansatz) und dann wird ausgären gelassen. Von jedem vergorenen Ansatz werden Proben entnommen, zur Bestimmung des Ca-Gehaltes, des Zuckers und der flüchtigen Säuren (wie bei a).

Präparative Aufarbeitung: Die vergorenen Flüssigkeiten (insgesamt etwa 20 l, entsprechend 600 g Cellulose) werden vereinigt, aufgekocht und filtriert, der Rückstand ausgewaschen. Bestimmung der unvergorenen Cellulose im Rückstand wie unter a). Filtrate und Washwasser auf ein kleines Volumen verdampft, mit der äquivalenten Menge 50%iger Schwefelsäure angesäuert; Gips abgesaugt, mit etwas Wasser ausgewaschen. Filtrat destilliert, ergibt Essigsäure, in den höheren Fraktionen Buttersäure. Trennung durch fraktionierte Destillation.

Anhang: Theoretisches.

a) Typen der Cellulosevergärungen. Eine genauere Einteilung läßt sich zur Zeit noch nicht geben, und zwar deshalb, weil die Untersuchungen fast stets mit Rohkulturen vorgenommen wurden, wobei Mischgärungen stattfanden. Als Gärungsprodukte wurden bisher beobachtet: Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure, Milchsäure, Äthanol, Methan, CO₂ und H₂. Je nach dem verwendeten Bakterienmischgemisch überwiegen bald die einen, bald die anderen Gärprodukte. Im allgemeinen scheinen folgende Typen vorzuliegen:

1. Überwiegen der Fettsäuren, insbesondere der Essigsäure (neben Buttersäure).
2. Reichliche Bildung von Alkohol (bis zu 25% des Ausgangsmaterials).
3. Bildung von Milchsäure (neben Essigsäure usw.).
4. Überwiegende Bildung von Methan und CO₂ (bei den eigentlichen Methanbakterien).

b) Technische Bedeutung der Cellulosevergärungen. Auf dieselbe hat insbesondere LANGWELL aufmerksam gemacht und Verfahren zur Vergärung cellulosehaltiger Stoffe im Großen ausgearbeitet (in einer Reihe von Patenten niedergelegt, 1919—1930). Als Ausgangsmaterialien kommen Maiskolben, Reisstroh, Treber, Hopfen und vieles andere in Frage. Die Bakterien werden aus Dung, Teich- und

Abwasserschlämme in Form von Rohkulturen isoliert und die Gärung bei 60–70° unter eventuellem Zusatz alkalischer Substanzen und von Nährsalzen etwa bei pH 5–9 durchgeführt. Das Mengenverhältnis der gebildeten Stoffe schwankt sehr in Abhängigkeit von den verwendeten Bakterienkulturen und den Versuchsbedingungen. So soll bei reduzierter Luftzufuhr vornehmlich Essigsäure entstehen, während bei stärkerer Luftzufuhr die Gärung abgeschwächt ist und zugleich Alkohol das Hauptprodukt sein soll (LANGWELL, 1927). Dies kann natürlich auch damit zusammenhängen, daß je nach den Bedingungen verschiedene Bakterien zur Wirkung gelangen. So wurde beispielsweise aus 12 kg trockener Maiskolben 1,5 kg Essigsäure, 0,3 kg Buttersäure und 0,77 kg Alkohol gewonnen. In einem anderen Fall wurden aus 3 Teilen Cellulose 1,15 Teile Essigsäure (57% d. Th.), 0,2 Teile Ameisensäure und wenig Milchsäure erhalten, bei niedrigerer Temperatur entstand als Hauptprodukt Buttersäure¹. Mit relativ reinen Kulturen wurde z. B. innerhalb weniger Tage die Hauptmenge der Cellulose (in 1,5%iger Suspension) zersetzt und die gewonnenen flüchtigen Säuren bestanden in der überwiegenden Menge aus Essigsäure neben wenig Buttersäure². Mit weiter gereinigten Kulturen wurde ein Anstieg in der Bildung von flüchtigen und nichtflüchtigen Säuren und eine Abnahme der Alkoholbildung erzielt; als flüchtige Säure trat dabei schließlich fast nur noch Essigsäure auf³. Nach den bisherigen Ergebnissen scheint vorläufig insbesondere die Gewinnung von Essigsäure aus cellulosehaltigen Stoffen technisch in Frage zu kommen, wobei daneben stets auch Buttersäure entsteht. Von Wichtigkeit ist, daß rohes Holzmehl infolge des Gehaltes an nativem Lignin so gut wie nicht vergoren wird, wohl aber Zellstoff verschiedener Herstellung⁴. Die hemmende Wirkung des Lignins ist durch die Art der Bindung von Cellulose und Lignin bedingt⁵. Anaerobe und aerobe Bakterien, die Cellulose abbauen, greifen Cellulose-Huminsäuren, Lignin-Huminsäuren sowie Lignin nicht an⁶. Manche Mikroorganismen vermögen jedoch auch Lignin selbst zu zersetzen⁷.

c) Über den **Chemismus der Cellulosevergärung** läßt sich bisher noch gar nichts aussagen, da erst Vergärungen mit absoluten Reinkulturen abzuwarten sind. Im übrigen dürfte es sich wohl um grundsätzlich analoge Prozesse handeln wie bei den heterofermentativen Milchsäuregärungen und bei den Butylgärungen.

d) Auch der **Chemismus der Methangärung** ist noch ungewiß, da es durchaus möglich erscheint, daß das Substrat zunächst von Begleitbakterien angegriffen wird, und daß erst die dabei entstehenden Spaltungsprodukte der eigentlichen Methangärung unterliegen. Nur bei der Methangärung von Formiaten wurde ein Bakterium in Reinkultur gewonnen; dasselbe verhielt sich aber sehr selektiv⁸.

¹ H. PRINGSHEIM: C. Bacter. II, 38, 513 (1912).

² VILJOEN, FRED und PETERSON: J. agricult. Sci. 16, 1 (1926).

³ SCOTT, FRED und PETERSON: Ind. Chem. 22, 731 (1930). — Vgl. auch SARLES, FRED und PETERSON: C. Bacter. II, 85, 401 (1932).

⁴ OLSON, PETERSON und SHERRARD: Ind. Eng. Chem. 29, 1026 (1937).

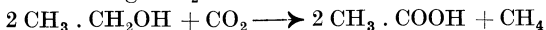
⁵ WAKSMAN und CORDON: Soil Science 45, 199 (1938).

⁶ BERL und KOERBER: Am. Soc. 60, 1596 (1938).

⁷ WAKSMAN und HUTCHING: Soil Science 42, 119 (1935).

⁸ STEPHENSON und STICKLAND: Biochemic. J. 27, 1517 (1933).

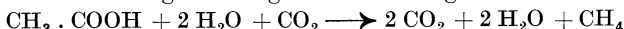
Dagegen ermöglichen die neuesten Arbeiten von BARKER bereits einen tieferen Einblick. So hatte ein Methanbakterientypus die Fähigkeit, Äthanol quantitativ in Essigsäure umzuwandeln und zugleich eine äquivalente Menge CO_2 zu Methan zu reduzieren¹:



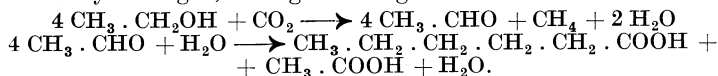
Weiterhin vermochten diese Bakterien auch Butylalkohol in analoger Weise umzusetzen. Aber auch Buttersäure wird unter Bildung von Essigsäure weiter umgewandelt:



Auch Essigsäure wird in Gegenwart von CO_2 weiter abgebaut, und zwar wahrscheinlich gemäß folgender Gleichung:



In einem anderen Fall² wurde durch eine Mischkultur zweier Bakterien Alkohol in erheblichem Maße in Essigsäure, Buttersäure und Capronsäure (37% des umgesetzten Alkohols) umgewandelt, wobei zugleich eine Reduktion von CO_2 zu Methan stattfand. Die Bildung von Buttersäure und Capronsäure soll dabei direkt über Acetaldehyd erfolgen, etwa gemäß folgendem Schema:



III. Oxydative Bakteriengärungen.

A. Die Essiggärung.

36. Übung:

Züchtung und Untersuchung der Essigbakterien.

a) **Isolierung von Essigbakterien aus Bier.** 10 ccm Lagerbier werden mit 0,2 ccm Eisessig versetzt (zwecks Unterdrückung von Mycodermen) und in einer PETRI-Schale bei 25—30° stehen gelassen. Nach einigen Tagen bildet sich eine dünne Haut von Bieressigbakterien an der Oberfläche. Mikroskopische Untersuchung. Reinzüchtung auf Bier- oder Würzeagar mit einem Gehalt von 2—4% Alkohol. Zur Weiterzüchtung kann Lagerbier mit 3 Vol.-% Alkohol dienen.

b) **Isolierung von Weinessigbakterien.** Wein wird mit etwas Wasser verdünnt und mit wenig Eisessig versetzt. Im übrigen wird wie oben vorgegangen. Reinzüchtung der Weinessigbakterien auf Weinagarplatten (der Wein wird vorher durch Zusatz von Kreide etwas entsäuert); auch die Weiterzüchtung erfolgt auf entsäuertem Wein mit 3—5 Vol.-% Alkohol.

¹ BARKER: Arch. f. Mikrobiol. 7, 404, 420 (1936).

² BARKER: Arch. f. Mikrobiol. 8, 415 (1937).

c) **Gewinnung von Schnell essigbakterien.** Rollspäne aus Schnell essigfabriken werden in Würze von 8° Bllg., die mit 2—3 Vol.-% Eisessig versetzt ist, eingetaucht; die Späne sollen zur Hälfte herausragen. Bei 30° entwickeln sich im Laufe einer Woche Hautinseln. Reinzüchtung durch Übertragung der Hautinseln auf Würze- oder Bieragarplatten. Weiterzüchtung in synthetischer Nährlösung (Nr. 30, S. 40), zeitweise abwechselnd mit Würze.

Zur *Trennung von Schnell essigbakterien und Bieressigbakterien* (z. B. aus Proben von Essigbildnern) verwendet man nährstoffarme Flüssigkeiten, auf denen Bieressigbakterien nicht fortkommen, z. B. Leitungswasser, das 3 Vol.-% Alkohol, 0,05% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,01% KCl und einige Tropfen Essigsäure enthält.

d) **Herstellung von Impfkulturen für Gäransätze.** Von den Reinkulturen, die zur Fortzüchtung dienen, wird nicht gleich der Gäransatz geimpft, sondern es wird zunächst eine „Impfkultur“ angelegt unter Benutzung des gleichen Nährbodens, der zur Vergärung kommen soll. Erst sobald hier kräftige Entwicklung stattgefunden hat, werden mit solchen Kulturen die Gäransätze geimpft (vgl. weiter unten).

e) **Gewöhnung an Substrate.** Dies ist besonders für Untersuchungen über die Oxydation verschiedener Zuckerarten, von Zuckercarbonsäuren oder anderer Substrate von Wichtigkeit: Vornahme von „Passagen“; die Bakterien werden zunächst in das betreffende Nährmedium eingepflegt; nach ausreichender Entwicklung bei bestimmter Temperatur (meist 25—30°) wird von dieser Kultur in eine frische Nährlösung übertragen (etwa alle 8—10 Tage). Dieser Vorgang wird des öfteren (etwa fünf- bis zehnmal) wiederholt und bei jeder Passage der Effekt festgestellt (z. B. durch Titration usw.)¹.

f) **Aufzüchtungen.** Wenn durch längere Zeit hindurch stets das gleiche Nährmedium zur Fortzüchtung verwendet wird, so kann das Wachstum wie auch das Oxydationsvermögen der Bakterien leiden. Es wird daher zweckmäßigerweise das Nährsubstrat von Zeit zu Zeit gewechselt. So zeigt z. B. *Acetobacter gluconicum* bei der dauernden Züchtung auf Hefewasser mit 5% Glucose Degenerationserscheinungen, indem sehr üppige Entwicklung unter starker Vergrößerung der Zellen stattfindet. Das Oxydationsvermögen ist dann beträchtlich herabgesetzt.

¹ Vgl. z. B. die Gewöhnung von *A. gluconicum* an d-Galaktose und Steigerung des Vermögens zur Bildung von d-Galaktonsäure: HERMANN und NEUSCHUL: *Biochem. Z.* **270**, 6 (1934).

Zweckmäßigerweise überträgt man in einem solchen Falle auf einen synthetischen Nährboden (vgl. z. B. Nr. 30, S. 40)¹.

37. Übung:

Gewinnung von Massenkulturen und Bakterienpräparaten.

a) Herstellung von Massenkulturen in Nährlösungen. Impfkultur (z. B. *A. pasteurianum* oder *A. orleanense* usw.), gezüchtet in Bierwürze von 8° Bllg. (unter Zusatz von etwa 2% Alkohol). Ansätze: Bierwürze wird 1—2 Stunden im Dampfsterilisator erhitzt, filtriert und auf 8° Bllg. verdünnt (eventuell noch 1% Eisessig zugesetzt). Die so vorbereitete Lösung wird in einige ERLÉNMEYER-Kolben oder FERNBACH-Kolben von etwa 2 l Inhalt zu je 100—200 ccm eingefüllt und noch zweimal fraktioniert sterilisiert. Zusatz der Impfkultur (etwa 5% des Ansatzes). Aufarbeitung nach etwa 1 Woche bei 28—29°. Gewinnung der Bakterienmassen durch Zentrifugieren in steriler Zentrifugieröhren (mit Gummistöpsel verschlossen); nach dem Abgießen der klaren Flüssigkeit wird jeweils weitere Bakterien-suspension eingefüllt und der Vorgang des öfteren wiederholt. Waschen der Bakterien durch Suspensieren derselben in physiologischer Kochsalzlösung² und nochmaliges Abschleudern. Wiederholung der Operation.

b) Herstellung von Massenkulturen auf Bieragarnährböden³. Bier wird durch Erhitzen zum größten Teil von Alkohol befreit, mittels Lauge neutralisiert (p_H 8, Umschlagpunkt von Phenolphthalein), mit 3% Agar und nach dem fraktionierten Sterilisieren mit 1% Alkohol versetzt. Nährboden in etwa 7 mm hoher Schicht in einer größeren Anzahl (20—25 Stück) großer steriler Doppelschalen (20 cm Durchmesser) ausgegossen (in einem sterilen Raum, z. B. Impfkasten). Impfung: Eine bei 25° auf Lagerbier gewachsene Kultur (z. B. des *A. ascendens*) mit dem doppelten Volumen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, homogenisiert und über dem erstarrten Bieragar in 1 mm starker Schicht ausgegossen. Nach 5 Tagen bei 25° werden die Kulturen mit physiologischer Kochsalzlösung (oder mit 1%iger Natriumsulfatlösung) unter eventueller Zuhilfenahme eines sterilen Glasspatels abgespült, die Suspension in einer sterilen Flasche gesammelt und wie unter a) weiter verarbeitet.

¹ Vgl. BERNHAUER und GÖRLICH: Biochem. Z. 280, 370 (1935).

² 9 g Kochsalz in 1 l Wasser.

³ Nach JANKE und KROPACSY: Biochem. Z. 278, 38 (1935).

c) Gewinnung „ruhender“ Bakterienkulturen¹. Prinzip: „Alterung“ der Bakterien durch Aufbewahren bei niedriger Temperatur zwecks Verbrauch von Reservestoffen. Abgeschleuderte, gewaschene Bakterienmasse (vgl. oben) in physiologischer Kochsalzlösung (oder 1%iger Natriumsulfatlösung) aufgeschwemmt und in einer Glasstöpselflasche auf der Schüttelmaschine vollkommen gleichmäßig verteilt. Alterung der Zellen (Verbrauch von Reservestoffen) durch etwa fünftägiges Verweilen im Eisschrank. Haltbarkeit ohne wesentliche Änderung des physiologischen Verhaltens etwa 3—4 Wochen im Eisschrank. Verwendung zur Durchführung von Reaktionen mit möglichst gleichartigem Zellmaterial und unabhängig vom Wachstum (die „ruhenden Bakterien“ bilden gewissermaßen einen Ersatz für Enzympräparate, sind aber weitaus wirksamer als diese).

d) Herstellung von Acetontrockenpräparaten². Die nach a oder b hergestellte Bakterienmasse (gewonnen aus z. B. 8 l Substrat) wird in 100 ccm Leitungswasser aufgeschlämmt (1 ccm davon wird zur Trockensubstanzbestimmung verwendet durch Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum, und 1 ccm zur Bestimmung der Anzahl der lebenden Bakterien nach einer Kultivierungsmethode, vgl. S. 54). Die Bakteriensuspension wird sodann allmählich (z. B. mittels einer Pipette) in etwa 1 l reines Aceton unter gutem Umrühren eintropfen gelassen; abgesaugt, zweimal mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum 24 Stunden getrocknet. Man erhält aus 8 l Würze 1,5—3 g gelbliches, leicht pulverisierbares Bakterientrockenpräparat.

38. Übung:

Die Essiggärung des Alkohols.

a) Analytischer Gärversuch in Nährlösungen. 200 ccm ungehopfte Bierwürze von 8° Bllg. wird zweimal fraktioniert sterilisiert, sodann werden 10 g keimfreier Alkohol (frisch destilliert, steril aufgefangen) zugesetzt, in einen 1000 ccm fassenden FERNBACH-Kolben mit Vorrichtung zur Probeentnahme (Abb. 15, S. 75) steril eingefüllt, mit einer gärkräftigen Kultur geimpft (*A. aceti* oder *A. pasteurianum* usw.) und bei 28—29° ruhig stehen gelassen³. Verfolgung des Gärverlaufes (Oxydationsverlaufes) durch Ti-

¹ Nach JANKE und KROPACSY: *Biochem. Z.* 278, 38 (1935).

² MÜLLER: *Biochem. Z.* 238, 253 (1931). — WIELAND und BERTHO: *A.* 467, 95 (1928).

³ Die sich bildende Bakterienhaut soll nicht untersinken, da sonst der Oxydationsverlauf gehemmt wird.

tration steril entnommener Proben (etwa 5 ccm); Probeentnahme (vgl. Abb. 15 b): Flüssigkeit durch Ansaugen entnommen (das Rohr kann durch öfteres Ansaugen und Ablaufenlassen ausgespült werden). Das gradierte Proberohr wird nach der Probeentnahme sofort gegen ein frisches ausgetauscht.

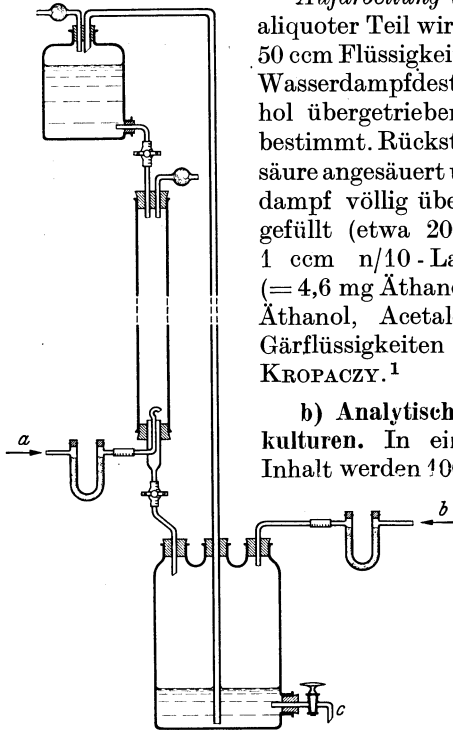


Abb. 33. Laboratoriumsessigbildner.

Aufarbeitung (nach 10—20 Tagen). Ein aliquoter Teil wird mit CaCO_3 versetzt (z. B. 50 ccm Flüssigkeit mit 3 g CaCO_3) und durch Wasserdampfdestillation der restliche Alkohol übergetrieben. In einer Probe Alkohol bestimmt. Rückstand filtriert, mit Schwefelsäure angesäuert und Essigsäure mit Wasserdampf völlig überdestilliert. Destillat aufgefüllt (etwa 200 ccm) und Probe titriert. 1 ccm n/10-Lauge = 6 mg Essigsäure (= 4,6 mg Äthanol). Eine Bestimmung von Äthanol, Acetaldehyd und Essigsäure in Gärflüssigkeiten beschreiben JANKE und KROPACZY.¹

b) Analytischer Gärversuch mit Massenkulturen. In einer Flasche von 300 ccm Inhalt werden 100 ccm steriler 5%iger Alkohollösung mit 1—2 g Bakterienmasse (hergestellt gemäß Übung 37 a oder b) versetzt und auf einer Schüttelmaschine unter Luftzutritt bei 20° behandelt. Entnahme von Proben und Ermittlung des Säuregehaltes durch Titration. Aufarbeitung wie bei a).

c) Präparativer Versuch nach dem Schnellessigverfahren². Der Laboratoriumsessigbildner (vgl. Abb. 33) besteht aus einem langen Glasrohr (etwa 110 × 5 cm), das abwechselnd mit ausgekochten Buchenholzspänen und Holzwole angefüllt wird. Zum Sterilisieren wird strömender Wasserdampf drei- bis viermal je 1 Stunde an aufeinanderfolgenden Tagen durchgeleitet. Sonstige Versuchs-

¹ JANKE und KROPACZY: Bio. Z. 278, 30 (1935).

² Vgl. HENNEBERG: Die Deutsche Essigindustrie 10, 146 (1906).
— S. auch HERMANN und NEUSCHUL: Z. Bact. II 93, 25 (1935).

ordnung aus Abb. 33 ersichtlich. Die Woulffsche Flasche hat etwa 10 l Inhalt, die obere Flasche etwa 5 l. Es werden etwa 8 l Essigmaische verwendet: z. B. 1500 ccm sterile Bierwürze von 8° Bllg., 500 ccm pasteurisierter Essig (etwa 10 Minuten auf 50° erhitzt) auf 7,5 l aufgefüllt und 500 ccm keimfrei aufgefängener Alkohol zugesetzt. Impfkultur: etwa 200 ccm im gleichen Medium vorentwickelte Essigbakterien (wie *A. orleanse*, *A. aceti*, *A. pasteurianum* usw.). Die Maische wird in die sterile Woulffsche Flasche eingefüllt und durch Preßluft in das obere Gefäß hinaufgetrieben, von wo sie tropfenweise über die Späne rieseln gelassen wird. Während des Betriebes wird durch den Bildner ständig sterile Luft durchgeleitet (bei a). Sobald die Flüssigkeit aus dem oberen Gefäß abgelaufen ist, wird dieselbe wieder durch Preßluft hinaufgedrückt (bei b). Die ganze Apparatur wird in einem Gärraum von 27—30° aufgestellt. Durch sterile Entnahme von Proben (bei c) und Titration derselben überzeugt man sich vom Verlauf der Gärung. Sobald die Oxydation beendet ist, kann frische Maische eingefüllt werden. Der Apparat kann auf diese Weise monatelang kontinuierlich in Betrieb gehalten werden. Diese Anordnung kann auch zur präparativen Erzeugung anderer Substanzen mittels Essigbakterien dienen (vgl. z. B. Übung 44 b, S. 231).

Anhang: Technologie der Essiggärung.

Ausgangsmaterialien: Für die Erzeugung von Spritessig (Hauptmenge) dient meist Rohsprit mit 6—10% Alkoholgehalt; als Nährstoffe werden etwa 20% Bier oder Malzextrakt usw. zugesetzt, zumeist aber anorganische Salze, und zwar etwa 50—150 g Nährsalzgemisch für 100 l reinen Alkohol (in Form von saurem Ammonium-, Kalium- und Natriumphosphat, ferner Ammonium- und Magnesiumsulfat). Zur Bereitung der sogenannten Qualitätessige dienen vergorene alkoholhaltige Flüssigkeiten, wie Wein, Bier, Malzwein, vergorene Getreide- und Kartoffelmaischen, Apfelwein, vergorene Fruchtsäfte, vergorener Honig usw.

Verfahren der Essigerzeugung: Es sind zwei Prinzipien verwirklicht, indem sich die Maische entweder (wenigstens zeitweise) in Bewegung oder aber völlig in Ruhe befindet. Am wichtigsten und allgemeinsten angewendet ist das Schnellessigverfahren, die anderen Verfahren sind heute nur noch in geringem Ausmaße in Verwendung.

Die *ruhenden Verfahren* ermöglichen die Erzeugung der feinsten Qualitätessige (insbesondere Weinessige, die besonders reich an Aromastoffen sind). *ORLEANS-Verfahren:* Vergärung des Weines in liegenden, halbgefüllten Fässern, oben mit Löchern zum Luftzutritt, mit einem Thermometer und mit einem Trichterrohr zum Nachfüllen frischer Maische versehen, unten mit einem Ablaufhahn oder Schwanenhals zum Ablassen des fertigen Weinessigs. Vornahme der Gärung bei etwa 20°; nach wenigen Tagen bildet sich eine Essighaut (zeitweises Absinken dieser und Bildung einer neuen Haut), Tem-

peraturanstieg während der Gärung in den Fässern um 2—3°. Gärdauer mehrere Wochen. Vielfach wird nur ein Teil des fertigen Weinessigs abgelassen und durch weiteren Zusatz von Wein oder Weimaische ergänzt. *PASTEUR-Verfahren*: Im Prinzip analog, aber relative Vergrößerung der Oberfläche durch Verwendung flacher, mit einem Deckel versehener Gärkufen mit Zulauföffnung, Ablaufrohr usw.

Unter den *Verfahren mit bewegter Maische* ist vor allem das *Schnell-essigverfahren* von Wichtigkeit: Benutzung von aufrechtstehenden Essigbildnern (in der Regel aus Holz), mit Buchenholzspänen gefüllt, an denen sich die Bakterien ansiedeln. Von oben läßt man die zu vergärende Maische langsam herabrieseln; infolge der großen Oberfläche und guten Luftversorgung findet rasche Oxydation statt. Während der Gärung erhöht sich die Innentemperatur, wodurch eine gleichmäßige Luftströmung durch die Späne bewirkt wird, indem frische Luft durch untere Zuglöcher eintreten kann. Die sich unten ansammelnde Maische wird jeweils wieder oben aufgegossen (meist automatisch nach verschiedenen Systemen). Höchstausaubeute 80—90%, in normal guten Fällen etwa 70% d. Th. Verluste insbesondere durch Verdunstung von Alkohol und Essigsäure durch den Luftstrom. Sonstige Verfahren weniger in Verwendung (bzw. meist außerhalb Deutschlands). *Verfahren von BOERHAAVE*: Je zwei Fässer mit Füllmaterial versehen, miteinander verbunden, abwechselnd mit Maische gefüllt und wieder entleert; die Essiggärung findet insbesondere in dem gerade leeren Faß statt, in dem also das Füllmaterial mit der Maische nur benetzt ist. *Verfahren von MICHAELIS*: Benutzung eines *Eintauchessigbildners* (das in einem korbartigen Behälter befindliche Füllmaterial mit den Essigbakterien wird zeitweise in die Maische eingetaucht) oder eines *Dreheessigbildners* (ein liegendes Faß, geteilt in einen größeren, mit Füllstoff versehenen, und einen kleineren, die Maische enthaltenden Teil; zeitweise Drehung des Fasses). *Englisches Generatorverfahren* (Rundpumpverfahren), insbesondere für die Erzeugung von Malzessig: Der Malzwein wird auf große Generatoren (versehen mit porösem Füllmaterial) verteilt und mit Hilfe von Pumpen wiederholt auf den Bildner zurückgegossen bis zur vollkommenen Oxydation des Alkohols.

39. Übung:

Zwischenprodukte der Essiggärung.

a) Abfangung von Acetaldehyd¹. In einem FERNBACH-Kolben von 2 l Inhalt werden 300 ccm Lösung (Hefeautolysat mit Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt oder ungehopfte Bierwürze von 8° Bllg.) zweimal fraktioniert sterilisiert, dann nochmals $\frac{1}{2}$ Stunde nach Zusatz von 45 g CaSO_3^2 und 18 g CaCO_3^3 . Schließlich werden 9 ccm Alkohol und die Impfkultur zugesetzt (etwa

¹ In Anlehnung an NEUBERG und NORD: Biochem. Z. **96**, 158 (1919).

² Natriumsulfid ist nicht verwendbar, da zu alkalisch.

³ Bildung freier schwefliger Säure ist zu vermeiden, da sie stark hemmend wirkt.

10—20 ccm einer Würze-Alkohol-Kultur von *A. pasteurianum* oder *ascendens*). Der Versuch wird bei 28—29° ruhig stehen gelassen. Nach einigen Tagen bildet sich eine dünne „Essighaut“. Vom 5. Tag an prüft man fortlaufend jeden Tag qualitativ eine steril entnommene Probe mittels Nitroprussidnatrium und Piperidin auf Acetaldehyd (vgl. S. 118). Versuchsabbruch etwa am 10. Tag und quantitative Bestimmung des Acetaldehyds (in etwa 100 ccm der Lösung; vgl. S. 119)¹ und der Essigsäure, nach Behandlung der Probe (etwa 50 ccm) mit Barytwasser und Filtration (Entfernung des Sulfits) mit nachfolgender Wasserdampfdestillation nach dem Ansäuern; Titration des Destillates².

In einem Parallelversuch kann man die Bildung von Essigsäure in Gegenwart von Calciumcarbonat feststellen; man geht dabei genau so vor, wie beim Hauptversuch, aber unter Fortlassung des Calciumsulfits (die hier bei der Aufarbeitung erhältlichen Essigsäurewerte sind wesentlich höher, und zwar etwa 7—8 g Essigsäure).

b) Dismutation des Acetaldehyds unter anaeroben Bedingungen³. Eine Aufschwemmung von *Acetobacter suboxydans* (entsprechend 4—5 g Trockengewicht) wird mit 10 g CaCO_3 und 20 ccm einer etwa 4%igen Acetaldehydlösung unter Zusatz von 1 ccm Toluol mit Leitungswasser auf 1000 ccm aufgefüllt und der Ansatz in einem gut verschlossenen Kolben unter CO_2 bei 37° unter öfterem Umschütteln stehen gelassen. Der Aldehyd ist dann meist verschwunden. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasserdampf destilliert. Bestimmung des Alkohols in üblicher Weise im Destillat. Bestimmung der Essigsäure nach dem Ansäuern des Rückstandes mit verdünnter Schwefelsäure und nochmalige Destillation; Titration des Destillates. Alkohol und Essigsäure entstehen in äquivalenten Mengen.

Hinsichtlich der Messung des Sauerstoffverbrauches durch Essigbakterien sowie der Methylenblauatmung und Chinonatmung der Essigbakterien sei auf die zusammenfassenden Beschreibungen in der Literatur verwiesen⁴.

¹ Man erhält etwa 0,2—0,6 g Acetaldehyd im Gesamtansatz.

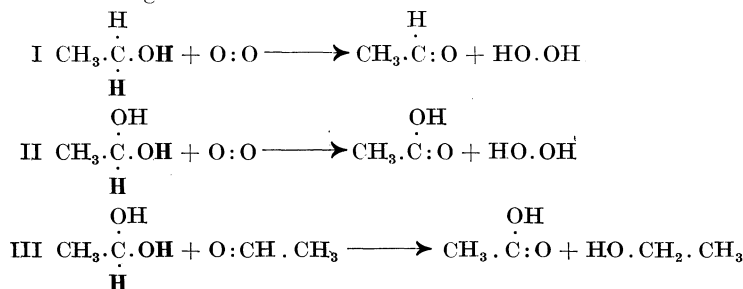
² Man erhält etwa 1—2 g Essigsäure im Gesamtansatz.

³ Vgl. SIMON: *Biochem. Z.* **224**, 253 (1930).

⁴ Vgl. insbesondere die eingehende Beschreibung der anzuwendenden Methodik in BERTHO-GRASSMANN: *Biochemisches Praktikum*, S. 165 ff, 151 ff. und 158 ff., Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1936.

Anhang: Zum Chemismus der Essiggärung.

Die Umwandlung des Alkohols zu Essigsäure führt über Acetaldehyd als Zwischenprodukt. So ist aus der Praxis der Essiggärung bekannt, daß bei unrichtiger Gärführung Acetaldehyd in erheblichen Mengen auftreten kann. Insbesondere durch Abfangung mittels Sulfid lassen sich beträchtliche Mengen Acetaldehyd festhalten (vgl. Übungsbeispiel 39a). Bei der Umwandlung des Alkohols in Acetaldehyd handelt es sich gemäß der WIELANDSchen Theorie um einen Dehydrierungsvorgang und auch der Acetaldehyd wird sodann bei der Essiggärung in erster Linie durch weitere Dehydrierung in Essigsäure umgewandelt, wenn auch in gewissem Umfange gleichfalls eine dismutative Umwandlung vor sich geht. Bei der Essiggärung finden demnach folgende Reaktionen statt:



Es überwiegen dabei nach WIELAND¹ unter aeroben Bedingungen die Dehydrierungsvorgänge I und II, bei denen der Sauerstoff die Rolle des Wasserstoffacceptors spielt. Die Reaktion III², bei der 1 Mol Acetaldehyd als H₂-Acceptor wirkt, findet vor allem unter anaeroben Bedingungen statt, in gewissem Umfang allerdings auch unter aeroben³. Ferner überwiegt dieser letztere Vorgang auch unter aeroben Bedingungen bei Hefen oder anderen Organismen, die auf den anaeroben Stoffwechsel eingestellt sind.

Hinsichtlich der Enzymchemie dieser Vorgänge scheint noch nicht endgültig erwiesen, ob die Dehydrase und Mutase der Essigbakterien völlig identisch ist⁴; jedenfalls dürfte bei der Aldehydmutase ein Co-Enzym wirksam sein, das nicht mit dem der Ketonaldehyd-mutase (Glutathion, vgl. S. 172) identisch ist.

An Stelle des Sauerstoffs (oder des Acetaldehyds) können bei den Dehydrierungsreaktionen auch andere, und zwar auch zellfremde Stoffe als Wasserstoffacceptoren wirken, so insbesondere Methylenblau oder Chinon, gemäß den Gleichungen:

¹ WIELAND: *Helvet. chim. Acta* **15**, 21 (1932).

² Vgl. NEUBERG und WINDISCH: *Naturwiss.* **13**, 993 (1925); *Biochem. Z.* **166**, 454 (1925) — NEUBERG und MOLINARI: *Naturwiss.* **14**, 758 (1926). — MOLINARI: *Biochem. Z.* **216**, 187 (1929).

³ Vgl. SIMON: *Biochem. Z.* **224**, 253 (1930); **243**, 401 (1931). — BERTHO und BASU: *A.* **485**, 26 (1931). — WIELAND: *Ang. Ch.* **28**, 582 (1931). — WINDISCH: *Biochem. Z.* **250**, 466 (1932).

⁴ Vgl. BERTHO: *A.* **474**, 57 (1929) und andererseits TANAKA: *Acta-phytochim.* **5**, 239 (1931).



Von diesen H-Acceptoren wird in ausgedehnter Weise bei der „Acceptor-Methodik“ Gebrauch gemacht¹.

Gemäß der WIELANDSchen Dehydrierungstheorie soll die Aufgabe der Dehydrasen (Dehydrogenasen, Hydrokinasen) in der Lockerung bzw. Aktivierung des Wasserstoffs der Substrate (Wasserstoffdonatoren) bestehen, der dann vom H₂-Acceptor (Sauerstoff, Aldehyd, Chinon, Methylenblau usw.) übernommen wird („Wasserstofftransport“). Die Dehydrierungstheorie ist daher auch für das Verständnis der anaeroben Zellvorgänge von größter Bedeutung (Oxydoreduktionen, Dismutationen).

Das bei aeroben Prozessen als primäres Hydrierungsprodukt des molekularen Sauerstoffs entstehende Wasserstoffsuperoxyd wird dann durch ein Enzym, die Katalase, unter Bildung von Wasser und Sauerstoff zerstört; dieselbe ist in allen aeroben Zellen weit verbreitet und hat daher wegen der Giftigkeit des Wasserstoffsuperoxyds eine sehr bedeutsame Funktion zu erfüllen. Dort wo die Katalase fehlt (bei vielen anoxydativen Organismen, wie z. B. vielen Milchsäurebakterien) kommt es auch tatsächlich unter bestimmten Bedingungen zu einer Anreicherung von Wasserstoffsuperoxyd, und zwar in einer dem Sauerstoffverbrauch äquivalenten Menge. Es ist demnach hier die WIELANDSche Dehydrierungstheorie voll bestätigt². Auch bei einem Essigbakterium (dem *Acetobacter peroxydans*) fehlt die Katalase völlig, aber trotzdem tritt hier kein Hydroperoxyd auf. Es zeigte sich jedoch, daß in diesem Fall H₂O₂ selbst als Wasserstoff-Acceptor wirkt³.

Auf Grund der Untersuchungen mit anderen Zellsystemen (Macerationsaft usw.) wurde wahrscheinlich gemacht, daß durch eine Pyridin-Flavin-Katalyse (Cozymase I + gelbes Oxydationsferment) (vgl. S. 140) der Alkohol zu Acetaldehyd unter Bildung von Hydroperoxyd dehydriert wird⁴. Sodann soll das Acetaldehydhydrat H₂ unter Bildung von Essigsäure an das Häminsystem (Cytochrom + Atmungsferment) abgeben, das dann mit molekularem Sauerstoff Wasser bildet (vgl. Nachtrag).

40. Übung:

Oxydation verschiedener Alkohole⁵.

a) Oxydation von n-Propylalkohol zu Propionsäure. In zwei FERNBACH-Kolben von 2 l Inhalt werden je 400 ccm Hefewasser, enthaltend 2% n-Propylalkohol in üblicher Weise mit *A. suboxydans* oder *ascendens* (vorbereitet in einem kleinen Ansatz

¹ Näheres vgl. besonders BERTHO-GRASSMANN: Biochemisches Praktikum. Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1936.

² Vgl. BERTHO und GLÜCK: A. 494, 159 (1932).

³ WIELAND und PISTOR: A. 522, 116 (1936). Hinsichtlich des sonstigen biochemischen Verhaltens von *A. peroxydans* vgl. WIELAND und PISTOR: A. 535, 205 (1938).

⁴ Vgl. NEGELEIN und WULFF: Bio. Z. 289, 436 (1937).

⁵ Vgl. dazu VISSER-T HOOFT: Diss. Delft 1925.

des gleichen Nährmediums) geimpft. Nach ungefähr 10 Tagen bei 28° Entnahme einer Probe und Titration; weitere Probeentnahmen in Intervallen von etwa 10 Tagen. Versuchsabbruch, sobald das Säuremaximum erreicht ist. Quantitative Bestimmung der Propionsäure durch Destillation und Titration einer entnommenen Probe (etwa 100—200 ccm). Der Inhalt des zweiten Kolbens wird zur Gänze der Destillation unterworfen, das Destillat mit n-Lauge neutralisiert und zur Trockne verdampft (propionsaures Natrium bleibt zurück).

Identifizierung der Propionsäure als p-Chlorphenacyl ester: 1 g p-Chlorphenacylbromid mit der berechneten Menge propionsauren Natriums (gelöst in wenig Wasser) und mit 10 ccm 95%igem Alkohol auf dem Wasserbad eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Beim Abkühlen findet Krystallisation statt. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol schmilzt der Propionsäure-p-Chlorphenacyl ester bei 98°.

b) Oxydation von Isopropylalkohol zu Aceton. Es sei hier die Durchführung dieser Oxydation mittels getöteter Essigbakterien angeführt¹. 1,8 g getötete Essigbakterien (Gewinnung vgl. Übung 37d) werden mit 1,8 g Calciumcarbonat und 18 ccm einer 3%igen Isopropylalkohollösung verrührt, auf Filtrierpapier ausgebreitet und in verschlossenen Gläsern 3 Stunden bei 25° aufbewahrt. Dann wird in wenig Wasser aufgenommen und in eine eisgekühlte Vorlage mit 10 ccm 30%iger Essigsäure, enthaltend 0,17 g p-Nitrophenylhydrazin, destilliert. Das in Form feiner gelber Nadeln auskrystallisierende Aceton-p-Nitrophenylhydrazon wird abgesaugt, mit 20%igem Alkohol gewaschen und aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 144—146°.

Anhang: Theoretisches.

Die Oxydation anderer primärer Alkohole erfolgt wohl in analoger Weise wie die des Äthanols. Beim Abbau des Methylalkohols scheinen drei Enzyme beteiligt zu sein, wie Versuche mit Acetonpräparaten des *A. pasteurianum* zeigten², und zwar eine Alkoholdehydrase, eine Aldehydrase, und ein Ameisensäure abbauendes Ferment, das bei der Acetonbehandlung unwirksam wird. Auch Formaldehyd konnte als Zwischenprodukt isoliert werden. — Propylalkohol wird durch die meisten Essigbakterien in der Regel leicht in Propionsäure überge-

¹ Nach MÜLLER: *Biochem. Z.* **238**, 253 (1931). — Die Oxydation kann auch mit lebenden Bakterien (*A. pasteurianum* u. a.) in ähnlicher Weise wie unter a oder mittels Suspensionen der lebenden Bakterien vorgenommen werden. Ferner kann auch die Sauerstoffabsorption im Mikrorespirationsapparat verfolgt werden.

² MÜLLER: *Bio. Z.* **254**, 97 (1932).

führt¹, am besten bewährte sich auch hier *A. suboxydans*². Auch über die Oxydation von n-Butylalkohol, Isobutylalkohol und Isoamylalkohol wurde berichtet.

Auch Isopropylalkohol wird durch zahlreiche Essigbakterien zu Aceton oxydiert. MÜLLER³ erzielte mittels lebendem *A. pasteurianum* eine 75%ige Umwandlung, durch Acetonpräparate, des gleichen Bakteriums quantitative Umsetzung. — Bei dieser Reaktion handelt es sich gleichfalls um eine Dehydrierung. Als H₂-Acceptor kann auch Chinon dienen⁴.

41. Übung:

Alkoholische Gärung der Essigbakterien⁵.

2 g Glucose werden mit einer Suspension der abzentrifugierten, gewaschenen und in sterilem Leitungswasser aufgeschwemmten Bakterien⁶ (entsprechend etwa 2 g Trockensubstanz) versetzt und das Ganze auf 200 ccm aufgefüllt. 10 ccm des Ansatzes werden in ein Eudiometer (vgl. S. 110) eingefüllt und bei 30° stehen gelassen. Die CO₂-Entwicklung wird im Laufe von 2—3 Tagen festgestellt. Der Hauptansatz verbleibt bei 30° in dem Kolben, der mit CO₂ oder N₂ gefüllt ist und der mit einem Gärverschluß versehen wird (noch zweckmäßiger ist es, die Gärung in einer Schüttelflasche unter dauerndem Schütteln durchzuführen). Nach Beendigung der Gärung wird an Proben die bakteriologische Prüfung und in aliquoten Teilen des Ansatzes die Alkoholbestimmung vorgenommen (vgl. S. 112). CO₂ und Alkohol entstehen in äquimolekularen Mengen. Die Gärung geht nur bis etwa 15—20% der Theorie vor sich.

Zur Kontrolle der CO₂-Entwicklung setzt man noch einen Blindversuch mit der Bakteriensuspension ohne Glucose im Eudiometer an; die dabei gefundene meist sehr geringe CO₂-Menge ist von der des Hauptversuches in Abzug zu bringen.

Anhang: Theoretisches.

Die Essigbakterien vermögen unter anaeroben Bedingungen normale alkoholische Gärung hervorzurufen und verfügen über ein komplettes Zymasystem; sie besitzen Carboxylase, Ketonaldehydmutase, Phosphatase und das Zymohexasesystem. So vermögen auch Essigbakterien Hexosediphosphat zu Methylglyoxal ab-

¹ HERMANN und NEUSCHUL: Bio. Z. **233**, 129 (1931) u. a.

² VISSER 'T HOOFT: Diss. Delft 1925.

³ MÜLLER: Bio. Z. **238**, 253 (1931).

⁴ MÜLLER: Bio. Z. **254**, 102 (1932).

⁵ Vgl. NEUBERG und SIMON: Biochem. Z. **197**, 259; **199**, 235 (1928).

— SIMON: Biochem. Z. **224**, 253 (1930).

⁶ *Acetobacter suboxydans* oder *A. pasteurianum* u. a.; gewonnen gemäß Übungsbeispiel 36a oder b.

zubauen¹. Diese Befunde bilden weiter Beispiele für die grundsätzliche Einheitlichkeit der biologischen Abbauprozesse. Manche Substrate, die durch die Essigbakterien nicht so leicht direkt oxydiert werden können, wie besonders Ketosen, werden jedoch allem Anschein nach auch unter aeroben Bedingungen wenigstens teilweise über die C₃-Körper abgebaut, wie das häufige Auftreten von Essigsäure zeigt. Auch beim Abbau von Aldosen oder Zuckercarbonsäuren werden vielfach kleine Mengen Essigsäure gebildet. Zweifellos ist jedoch das Vermögen zum „normalen“ Zuckerabbau bei den Essigbakterien sehr geschwächt. Vgl. auch Nachtrag.

B. Erzeugung von Zuckerarten.

42. Übung:

Darstellung von l-Sorbose.

a) Auswahl geeigneter Bakterien². In einer größeren Anzahl von ERLÉNMEYER-Kolben von 200 ccm Inhalt werden je 50 ccm Nährlösung nach dem Sterilisieren mit Kulturen verschiedener Essigbakterien wie *A. xylinum*, *xylinoides*, *gluconicum*, *orleanense* usw. geimpft. Nährlösung: 5% Sorbit (Sionon der I. G.-Farbenindustrie) in Hefeextrakt (5 Teile Hefe auf 100 Teile Wasser, Herstellung vgl. S. 34). Temperatur 26—28°. Vom 5. Tag an Probeentnahme von je 1—2 ccm Lösung und Bestimmung des Reduktionsvermögens nach Bertrands Methode. Etwa alle 3 Tage weitere Entnahme von Proben und Analyse derselben. Nach etwa 10—25 Tagen ist die Oxydation stets beendet. Darstellung der Resultate in Form von Kurven. Reduktionskurven vgl. S. 276.

b) Präparative Gewinnung von l-Sorbose mittels des Ruheverfahrens. Einige FERNBACH-Kolben von je 5 l Inhalt mit je 1 l Nährlösung (wie bei a), aber mit 20% Sorbit³) beschickt, sterilisiert (entweder fraktioniert oder unter schwachem Überdruck) und mit einer aktiven Kultur von *A. suboxydans* geimpft (je 10 ccm einer einige Tage alten Kultur, wie unter a). Etwa 8—10 Tage bei 26—28° belassen (bei weniger aktiven Kulturen dauert die Oxydation länger, manchmal auch 30—40 Tage).

Aufarbeitung: Alle Lösungen vereinigt und mit Bleiacetatlösung gefällt (für je 1 l Flüssigkeit etwa 5—8 g Bleiacetat): Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt und im Vakuum zum Sirup ver-

¹ NEUBERG und SIMON: Biochem. Z. **253**, 225 (1932).

² BERNHAUER und GÖRLICH: Biochem. Z. **280**, 375 (1935). Vgl. auch RASUMOWSKAJA: Arch. Sci. biol. **43**, 209 (1936).

³ Nach FULMER, DUNNING, GUYMON und UNDERKOFLEK [Am. Soc. **58**, 1012 (1936)] ergaben auch noch 35%ige Sorbitlösungen in 14 Tagen eine 80%ige Ausbeute an l-Sorbose.

dampft. Die l-Sorbose krystallisiert in weißen, schon fast reinen Krystallen aus. Schmelzpunkt 160—161°. Absaugen, mit Methanol waschen. Durch Einengen der Mutterlauge im Vakuum und analoge Behandlung sind noch weitere Mengen erhältlich. Gesamtausbeute gegen 70%. Umkrystallisieren aus wenig heißem Wasser oder aus Methanol.

c) Präparative Gewinnung von l-Sorbose nach dem Durchlüftungsverfahren¹. In einem 2 l-KLUYVER-Kolben (vgl. S. 76) werden 1500 ccm Nährlösung (enthaltend 15% Sorbit², 0,5% Difco und 0,1% Eisessig) nach dem Sterilisieren mit 20—30 ccm einer 2 Tage alten Kultur des *A. suboxydans* geimpft³. Dauernde Durchleitung von steriler Luft (Wattefilter) bei 26—28°. Zeitweise Entnahme von Proben (0,5—2 ccm) und Bestimmung des Reduktionsvermögens. Sobald dasselbe nicht mehr steigt (etwa nach 6—8 Tagen) wird der Versuch abgebrochen und wie unter b) auf Sorbose verarbeitet. Ausbeute 70—80% des angewendeten Sorbits (manchmal auch noch höher).

Anhang: Technische Gewinnung von l-Sorbose⁴.

Man arbeitet entweder nach dem Durchlüftungsverfahren, oder am besten nach dem Gärtrommelverfahren⁵, da dabei die Vermischung der Flüssigkeit mit der Luft besonders intensiv ist. Die um eine horizontale Achse rotierende Gärtrommel besitzt im Inneren Schaufeln, mit deren Hilfe die Flüssigkeit immer wieder hochgehoben und ver-

¹ Nach Versuchen von H. KNOBLOCH (Diss., Prag 1938) und im Anschluß an BOESEKEN und LEEFERS: *Rec. trav. Pays Bas* **54**, 861 (1935). Vgl. auch KRESSLING: *Mikrobiol.* **6**, 898 (1937).

² Auch 25%ige Sorbitlösungen können noch nach diesem Verfahren in guter Ausbeute umgesetzt werden, doch dauert dann der Prozeß entsprechend länger.

³ Von größter Bedeutung für die Aktivität der Bakterien ist die Art und Dauer der Vorzüchtung derselben. Vor allem müssen die verwendeten Kulturen jung (etwa 2 Tage alt) und auf neutralem Nährboden vorgezüchtet sein. — Hinsichtlich der Abhängigkeit der aeroben und anaeroben Aktivität vieler Bakteriendehydrasen vom Alter der Kulturen (von der „Wachstumsperiode“) vgl. WOOLDRIDGE, KNOX und GLASS: *Bioch. J.* **30**, 926 (1936) sowie WOOLDRIDGE und GLASS: *Bioch. J.* **31**, 526 (1937). — Hinsichtlich der Aktivität der Bakterien zur Bildung und zum weiteren Abbau von Gluconsäure vgl. BUTLIN: *Bioch. J.* **30**, 1870 (1936); **32**, 508, 1185 (1938). — KLUYVER und BOEZAARDT: *Rec. trav. Pays-Bas* **57**, 609 (1938).

⁴ Vgl. WELLS, STUBBS, LOCKWOOD und ROE: *Ind. Eng. Chem.* **29**, 1385 (1937).

⁵ HERRICK, HELLBACH und MAY: *Ind. Eng. Chem.* **27**, 681 (1935). — Das Verfahren wurde ursprünglich für Pilzoxydationen ausgearbeitet (vgl. S. 242), hat sich aber auch für Oxydationen mittels Essigbakterien vorzüglich bewährt. — Vgl. A. P. 2,121533 (1938). — C. 1938 II 3622.

stäubt wird. Dadurch wird die Lösung in sehr innige Berührung mit der Luft gebracht. Außerdem kann dabei unter einem Überdruck von 2–3 Atm. gearbeitet werden, wodurch der Oxydationsprozeß eine weitere erhebliche Beschleunigung erfährt. Die günstigste Drehungsgeschwindigkeit der Gärtrommel und die geeignetste Menge der durchströmenden Luft müssen genau ermittelt werden. — Besonders wichtig ist weiterhin die Vorbereitung eines möglichst aktiven Impfmateri- als¹. Es gelang unter geeigneten Bedingungen Sorbit in 15 bis 20%iger Lösung innerhalb 24–33 Stunden in hoher Ausbeute (über 90%) zu l-Sorbose zu oxydieren. Das Verfahren hat zweifellos auch für andere Oxydationen mittels Essigbakterien noch eine große Zukunft.

43. Übung:

Darstellung von Dioxyaceton.

a) **Auswahl geeigneter Bakterien.** Ebenso durchzuführen wie in Übung 42 a, aber mit 5% Glycerin. Reduktionskurve für Dioxyaceton vgl. S. 276.

b) **Präparative Darstellung von Dioxyaceton mittels des Ruheverfahrens².** In einem großen Emailletopf werden 2 l Leitungswasser zum Sieden erhitzt, mit einem Brei aus 750 g frischer, abgepresster Bierhefe und 1 l heißem Wasser versetzt und unter dauerndem Rühren 20 Minuten gekocht; absetzen lassen, dekantieren, Rest filtrieren (oder das Ganze nach dem Erkalten sofort zentrifugieren). Abkochung mit 100 ccm (= 123 g) reinem Glycerin (D. A. B. VI) versetzt; mit Leitungswasser auf 10 l aufgefüllt und auf vier Stehrundkolben von je 5 l Inhalt verteilt³. Diese fraktioniert sterilisiert und mit *Acetobacter suboxydans* geimpft (pro Kolben 50 ccm einer kräftig entwickelten analogen Hefewasser-Glycerin-Kultur). Bei 25–30° stehen gelassen. Vom 8. Tage an alle 2 Tage Probe (5 ccm) entnommen und Reduktionsvermögen bestimmt. Nach etwa 12 Tagen ist das Maximum erreicht.

Aufarbeitung: Lösungen vereinigt, mit CaCO₃, Kieselgur und Tierkohle versetzt und filtriert. Filtrate im Verdunstungskasten und zum Schluß im Vakuum bei 33° eingengt. Sirup mit so viel Alkohol aufgenommen, daß erneuter Zusatz keine Trübung mehr

¹ Vgl. Note³ S. 227.

² Nach NEUBERG und HOFMANN: Bio. Z. 279, 318 (1935). Vgl. auch UNDERKOFLEB und FULMER: Am. Soc. 59, 301 (1937).

³ An Stelle des auf diese Weise gewonnenen Hefewassers kann wie in Übung 42 c auch Hefeextrakt „Difco“ in einer Konzentration von 0,3–0,5%₀ verwendet werden.

verursacht. Filtriert, Alkohol zum größten Teil im Vakuum verdampft, Rückstand (etwa 250 ccm) in 3 l Aceton eingerührt. Abscheidung eines zähen Sirups, abdekantiert. Lösung im Vakuum verdampft, Sirup im Vakuumexsiccator von Aceton und Wasser vollständig befreit, angeimpft, im Eisschrank aufbewahrt; Krystallbrei nach etwa 2 Tagen mit kaltem Aceton verrieben, abgesaugt, mit kaltem Alkohol gewaschen. Aus dem Filtrat in analoger Weise ein weiterer Anteil erhältlich. Gesamtausbeute 95 g bereits fast reines Produkt (77% d. Th.). Weitere Reinigung: in heißem Alkohol lösen, in viel Aceton eingießen, mit Tierkohle schütteln, filtrieren, zum Sirup einengen, auskrystallisieren lassen, ergibt völlig reines Produkt.

c) **Präparative Darstellung von Dioxyaceton nach dem Durchlüftungsverfahren**¹. Man geht ebenso wie in Übung 42c vor, nur daß man 7% Glycerin² verwendet. Man impft mit 20—30 ccm einer 2 Tage alten Kultur des *A. suboxydans* im gleichen Medium, aber ohne Essigsäure. Nach 48—60 Stunden ist dasselbe so gut wie quantitativ zu Dioxyaceton oxydiert. Aufarbeitung wie unter b).

Anhang: Die Oxydation von Zuckeralkoholen zu Zuckern.

Wir haben hier grundsätzlich zweierlei Vorgänge zu unterscheiden, nämlich, je nachdem ob eine primäre oder eine sekundäre Carbinolgruppe angegriffen wird; dabei kommt es also entweder zur Bildung von Aldosen oder von Ketosen³.

a) **Bildung von Aldosen** wurde bisher nur selten beobachtet (der Vorgang ist auch noch nicht endgültig bewiesen); z. B. Mannit \rightarrow d-Mannose (Hauptvorgang \rightarrow d-Fructose, vgl. unten), eventuell auch d-Dulcit \rightarrow d-Galaktose.

b) **Bildung von Ketosen bzw. von Oxy-keto-Verbindungen**⁴ findet sehr häufig statt, und zwar:

Glykole: Bildung von Acetol aus Propylenglykol oder Acetoin aus 2, 3-Butylenglykol.

¹ Nach Versuchen von H. KNOBLOCH: Diss., Prag 1938.

² Höher prozentige Glycerinlösungen werden nur bis zu einem Gehalt von etwa 7% Dioxyaceton umgesetzt. Die Menge an Difco kann auch herabgesetzt werden. Wenn dasselbe völlig fortgelassen wird, ist die Umsetzung verlangsamt und unvollständig.

³ Literatur vgl. BERNHAUER: Die oxydativen Gärungen. Berlin: Julius Springer 1932. — Vgl. ferner BUTLIN: The biochemical activities of the acetic acid bacteria, Chem. Res., Spez. Rep. Nr 2, London 1936. — BERNHAUER: Biochemie der Essigbakterien, Erg. Enzymf. 7, 246 (1938).

⁴ HANN, TILDEN und HUDSON: Am. Soc. 60, 1201 (1938).

Glycerin: Bildung von Dioxyaceton.

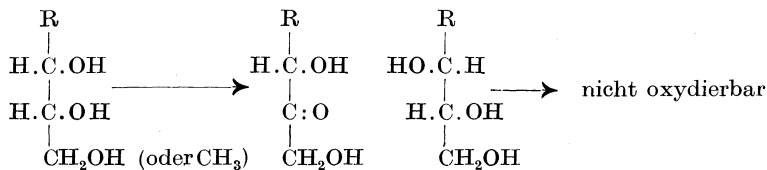
Tetrite: Erythrose aus Erythrit¹.

Pentite: l-Xylo-ketose aus l-Arabit.

Hexite: l-Sorbose aus d-Sorbit, d-Fructose aus Mannit.

Heptite: Perseulose aus Perseit, Glucoheptulose aus Glucoheptit.

Auf Grund der gemachten Befunde wurde eine allgemeine Gesetzmäßigkeit für die Oxydation von sekundären Carbinolgruppen durch Essigbakterien abgeleitet (Bertrandsche Regel); und zwar soll die Oxydation nur dann stattfinden, wenn der zu oxydierenden Carbinolgruppe eine zweite OH-Gruppe benachbart ist, die sich in der Projektionsformel in cis-Lage befindet; dagegen werden Carbinolgruppen bei denen diese Voraussetzung nicht erfüllt ist, nicht angegriffen:



Hinsichtlich einer Einschränkung dieser Regel vgl. S. 234.

Aus i-Inosit entsteht durch Einwirkung von *A. suboxydans* eine Diketoverbindung².

Über die Enzymchemie dieser Oxydationen liegen noch keine eingehenderen Untersuchungen vor, vermutlich handelt es sich aber auch hier um eine Dehydrierung, die durch das Pyridin-Flavin-System katalysiert wird.

C. Bildung und Abbau von Zuckercarbonsäuren.

44. Übung:

Darstellung von d-Gluconsäure.

a) **Präparativer Versuch nach dem Ruhe-Verfahren.** Einige FERNBACH-Kolben von 5 l Inhalt mit je 1 l Nährlösung (10% Glucose in Hefewasser mit 3% CaCO₃) nach dem Sterilisieren mit einer Kultur des *A. suboxydans* oder *xylum* usw. geimpft. 12—15 Tage bei 26—28° stehen gelassen. Einer der Kolben wird zur Probeentnahme eingerichtet (vgl. Abb. 15, S. 75). Probeentnahme etwa am 6., 9., 12. und 15. Tag: Filtration, Bestimmung des Ca-Gehaltes (vgl. S. 160) an 10 ccm, Reduktionsvermögen (nach BERTRAND, vgl. S. 160) an 1 ccm, später bis 5 ccm Probe. Abnahme des

¹ Vgl. dazu auch die Arbeit von WHISTLER und UNDERKOFER: Am. Soc. 60, 2507 (1938).

² DUNNING, FULMER, GUYMON und UNDERKOFER: Science (New York) 87, 72 (1938).

Glucosegehaltes¹ und Anstieg des Ca-Gluconatgehaltes. 1 ccm n/10-KMnO₄ = 2 mg Ca = 22,5 mg Ca-Gluconat (.H₂O) = 19,6 mg Gluconsäure (entspricht 18 mg Glucose).

Aufarbeitung (sobald das Maximum des Ca-Gehaltes erreicht ist): Lösungen vereinigt, unter Zusatz von etwas Calciumhydroxyd völlig abneutralisiert, aufgeköcht und filtriert (alles in einem großen Emailletpf), Bakterienhäute ausgepreßt. Filtrat im Vakuum zum dünnen Sirup eingeengt. Beim Stehen, eventuell erst nach dem Animpfen mit Ca-Gluconat erstarrt das ganze zu einem Krystallbrei. Scharf abgesaugt, mit etwa 50%igem Alkohol angerührt und wieder abgesaugt, nachgewaschen (rascher kommt man durch Abpressen in einer hydraulischen Presse zum Ziel). Aus heißem Wasser umkrystallisiert (etwa 4 Teile Wasser auf 1 Teil Substanz) und wie oben ausgewaschen (bis kein Reduktionsvermögen mehr vorhanden ist). Ausbeute 70—80%.

b) Präparativer Versuch nach dem Aufgußverfahren, grundsätzlich analog wie Übung 38c².

Anhang: Theoretisches.

1. Oxydation anderer Aldosen zu Aldonsäuren. *Hexosen.* Bildung von d-Galaktonsäure aus Galaktose^{3,4}, sowie von d-Mannonsäure aus Mannose⁵. In diesen Fällen scheint insbesondere die Gewöhnung der Bakterien an das zu oxydierende Substrat von großer Bedeutung; so gelang es mit Hilfe von Passagen das Oxydationsvermögen des *A. gluconicum* gegenüber den erwähnten Substraten sehr stark zu erhöhen^{4,5}.

Pentosen: Bildung von l-Arabonsäure aus l-Arabinose³ und von l-Xylonsäure aus l-Xylose³.

2. Enzymchemie der Gluconsäurebildung. Das dabei wirksame Enzym ist eine typische Dehydrase⁶ und steht etwa zwischen der Anaero-Gluco-dehydrase der Leber⁷ und der Aero-Gluco-dehydrase der Schimmelpilze (vgl. S. 242). Der Dehydrierungsvorgang ist jedenfalls auch hier als Pyridinkatalyse aufzufassen.

¹ Bei länger dauernden Versuchen steigt das Reduktionsvermögen wieder an infolge der Bildung von Ketosäuren. Daher muß der Versuch rechtzeitig abgebrochen werden.

² Näheres vgl. HERMANN und NEUSCHUL: C. Bacter. II, 93, 25 (1935). — Versuche zur Übertragung dieser Methode in halbtechnischen Maßstab ergaben kein befriedigendes Ergebnis, da die Infektionsgefahr nicht beseitigt werden konnte (Privatmitteilung von Dr. DÜLL, Hamburg).

³ BERTRAND: C. r. 127, 729 (1898); Bl. (3) 19, 1003 (1898); A. ch. (8) 3, 275 (1904).

⁴ HERMANN und NEUSCHUL: Biochem. Z. 270, 6 (1934).

⁵ HERMANN und NEUSCHUL: Bl. Soc. Biol. 18, 390 (1936).

⁶ Vgl. TANAKA: Acta phytochim. 7, 265 (1933).

⁷ Vgl. dazu HARRISON: Erg. Enzymf. 4, 297 (1935).

45. Übung:

Einfache Oxydationsprodukte der d-Gluconsäure.

a) Darstellung der d-5-Ketogluconsäure¹. Einige FERNBACH-Kolben mit je 1 l Nährlösung (5% Ca-Gluconat, 0,2% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,025% MgSO_4 und die 1% Hefe entsprechende Menge Hefeextrakt) nach dem Sterilisieren geimpft (mit je 10—20 ccm einer Kultur des *A. gluconicum* oder *A. suboxydans muciparum*² auf Glucose oder Ca-Gluconat in Hefewasser), 30—36 Tage bei 26—28°.

Aufarbeitung: Gewinnung des in großen Krystallen abgetrennten Ca-5-Ketogluconates durch Abdekantieren der aufgeschlämmten Bakterien und Waschen mit Wasser; Krystallmasse aus den Kolben schließlich gemeinsam abgesaugt. Weitere Mengen manchmal erhältlich durch Einengen der vereinigten Filtrate im Vakuum auf etwa $\frac{1}{4}$ des Volumens. Gesamtausbeute gegen 70%. Reinigung: 1 Teil des rohen Salzes in 1 Teil 20%iger Salzsäure gelöst, mit 10 Teilen Wasser versetzt, filtriert und 4 Teile Na-Acetat in 5 Teilen Wasser hinzugefügt. Nach einiger Zeit krystallisiert das reine Ca-Salz in einer Ausbeute von 80—90% des Rohproduktes aus (eine weitere Menge ist aus der Mutterlauge gewinnbar). Identifizierungsreaktionen:

Orcinprobe: Etwas Ca-5-Ketogluconat wird in Salzsäure gelöst und mit einigen ccm Reagens versetzt (1 g Orcin in 500 ccm 25%iger Salzsäure mit 25 Tropfen einer 10%igen Eisenchloridlösung versetzt): Intensiv grüne Färbung, löslich in Amylalkohol.

Phloroglucinprobe: Etwas Ca-5-Ketogluconat wird in 1 bis 2 ccm 18%iger Salzsäure gelöst und nach dem Zusatz von etwas Phloroglucin einige Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt: Dunkelgrüne Färbung (später braun werdend).

b) Darstellung der d-2-Ketogluconsäure². 6 HOULE-Kolben mit je 300 ccm Nährlösung (4% Kaliumgluconat³ und 1% Gluconsäure⁴ in Hefewasser, das 5% Hefe entspricht). Nach dem Sterili-

¹ Vgl. BERNHAUER und GÖRLICH: Biochem. Z. 280, 367 (1935).

² H. KNOBLOCH: Diss., Prag 1938.

³ Hergestellt durch Umsetzen einer Lösung von Ca-Gluconat mit der äquivalenten Menge Kaliumcarbonat. Nach dem Verdampfen des Filtrates im Vakuum scheidet sich das K-Gluconat als krystallisierte Masse aus.

⁴ Hergestellt durch Umsetzen des Ca-Gluconates mit der äquivalenten Menge Schwefelsäure oder Oxalsäure. Der nach dem Einengen des Filtrates im Vakuum erhältliche Sirup wird durch Behandlung mit Aceton in krystallisierte Form übergeführt. Durch weitere Behandlung mit Aceton erhält man ein weißes Produkt [vgl. DRP. 564434 (1931)].

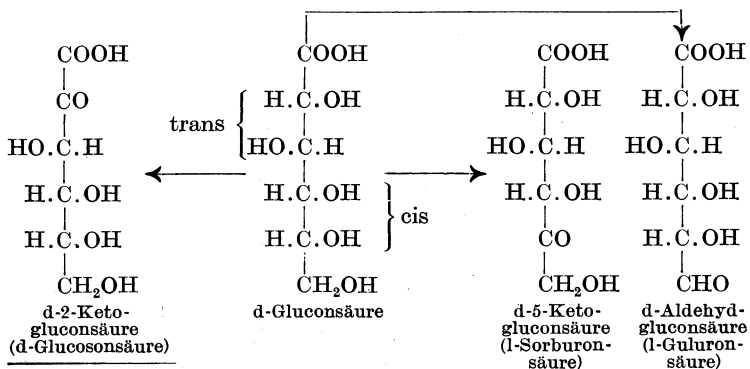
sieren mit je 10—20 ccm einer jungen Kultur von *A. suboxydans* oder eines anderen geeigneten Bakteriums im gleichen Medium geimpft. Versuchsdauer 40—60 Tage bei 26—28°.

Aufarbeitung: Vereinigte Filtrate aufgefüllt. Probeentnahme zur Bestimmung des Reduktionsvermögens. (Die Umsetzung in 2-Ketogluconsäure beträgt etwa 75%). — Rest der Lösung mit Bleiacetat versetzt (wie in Übung 42b). Niederschlag abfiltriert, Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt, Lösung nach dem Filtrieren im Vakuum zum dünnen Sirup verdampft und mit Alkohol bis zur schwachen Trübung versetzt (dann vorteilhafterweise mit 2-ketogluconsaurem Kalium geimpft); nach mehrtägigem Stehen im Vakuum über Ätznatron krystallisiert das 2-ketogluconsaure Kalium aus, das nun in einigen Fraktionen gewonnen wird. Man erhält so 40—50 g an krystallisiertem K-Salz. [Die Mutterlauge zeigt in der Regel starke Reaktion mit Naphthoresorcin-Salzsäure, was auf die Anwesenheit von l-Guluronsäure (Aldehydgluconsäure) hinweist: Rotviolette Färbung, löslich in Äther.]

Identifizierung der 2-Ketogluconsäure mittels ihres Chinoxalinderivates¹: 0,2 g des K-Salzes werden in 1 ccm Wasser gelöst und mit 0,1 ccm konzentrierter Salzsäure und 0,12 g o-Phenylen-diamin versetzt; beim Umrühren findet Lösung statt. Nach kurzer Zeit erstarrt die Lösung zu einem Krystallbrei; abgesaugt, mit Wasser gewaschen, aus heißem Wasser umkrystallisiert. Schmelzpunkt 199—200° (unter Zersetzung).

Anhang: Theoretisches.

Der Abbau der Gluconsäure kann in dreifacher Richtung erfolgen, und zwar: entweder werden sekundäre Carbinolgruppen angegriffen, oder es wird die primäre Carbinolgruppe oxydiert:



¹ Vgl. OHLE: B. 67, 155 (1934).

Durch den Befund über die Bildung der 2-Ketogluconsäure¹ erscheint auch in gewissem Sinn die BERTRANDSche Regel (vgl. S. 230) durchbrochen, indem es sich in diesem Fall um die Oxydation einer Carbinolgruppe handelt, deren benachbarte OH-Gruppe sich in Transstellung befindet. Die Oxydationsfähigkeit dieser Gruppe könnte wohl mit der Nachbarschaft der Carboxylgruppe zusammenhängen. Die Isolierung und Reindarstellung der Aldehydgluconsäure ist mit Schwierigkeiten verknüpft², so daß der endgültige Konstitutionsbeweis noch aussteht.

IV. Schimmelpilzgärungen.

A. Kultivierung der Pilze und einfache Oxydationsprozesse.

46. Übung:

Züchtung von Schimmelpilzen und Gewinnung von Sporenkulturen.

a) **Isolierung von Pilzen aus natürlichen Substraten.** Man läßt in Schalen verschiedene natürliche Nährböden wie Brot, saure Früchte usw. offen stehen und beobachtet das Auftreten von Pilzkulturen. Von den sich entwickelnden Pilzen werden mittels der Platinnadel Conidiosporen abgeimpft und auf Würzeagarplatten übertragen (PETRI-Schalen); diese läßt man bei 25—35° stehen, beobachtet das Auskeimen der Sporen und impft bald auf frische Platten ab. Schließlich sucht man die erhaltenen Pilze durch makroskopische und mikroskopische Untersuchung zu identifizieren³.

b) **Züchtung von Pilzen aus einer einzelnen Conidiospore.** Von einer Röhrenchenkultur des betreffenden Pilzes werden Conidiosporen mit der Impfnadel unter sterilen Bedingungen in ein kleines Fläschchen, enthaltend 5 ccm steriles Leitungswasser und 5—10 Tropfen Alkohol, gebracht und die Sporen durch kräftiges Schütteln voneinander getrennt. Ein Tropfen dieser Suspension wird dann zu 5 ccm Wasser in einem zweiten Fläschchen hinzugefügt und nach jedesmaligem guten Schütteln dieser Vorgang fünf- bis sechsmal wiederholt. Schließlich wird die Flüssigkeit der beiden letzten Fläschchen auf je eine fertige Würzeagarplatte aufgegossen, das überschüssige Wasser durch Umdrehen der PETRI-Schale im Deckel gesammelt und entfernt. Nach etwa 24stündigem Verweilen in einer feuchten Kammer

¹ BERNHAUER und GÖRLICH: *Biochem. Z.* **280**, 367 (1935). — Vgl. auch BERNHAUER und KNOBLOCH: *Naturw.* **26**, 819 (1938).

² TAKAHASHI und ASAI: *C. Bacter.* **II**, 84, 193 (1931). — BERNHAUER und IRRGANG: *Biochem. Z.* **280**, 360 (1935).

³ Vgl. die einschlägige botanisch-mycologische Literatur (s. S. 26 ff.).

bei 28—35° (je nach der Art des Pilzes) wird von den einzelnen Mycelinseln auf Agarröhrchen abgeimpft. Falls ein Mikro-manipulator zur Verfügung steht, führt man die Isolierung einzelner Sporen mit dessen Hilfe durch¹.

Zur Fortzucht der Schimmelpilze dienen zumeist Würze-agarröhrchen (Schrägagar; vgl. S. 31).

c) Anlegung von Impfkulturen und Übertragung derselben auf flüssige Substrate. Von den Röhrchen, die zur Fortzucht dienen, werden vor dem Ansetzen größerer Pilzkulturen bzw. Gäransätze Sporen auf frische Röhrchen übertragen (bei größeren Ansätzen empfiehlt sich die Anwendung von Agarplatten in Roux-Kolben). Sobald in diesen kräftige Sporenbildung stattgefunden hat, wird eine Sporensuspension in sterilem Wasser zwecks Impfung flüssiger Substrate hergestellt und zwar: Man fügt in ein Kulturröhrchen mittels einer Pipette einige Kubikzentimeter steriles Wasser und schwemmt mit Hilfe eines Platindrahtes die Sporen in der Flüssigkeit auf und spült des öfteren mit Wasser nach. Die in einem sterilen Kölbchen gesammelte Sporenaufschwemmung wird dann zu dem betreffenden Ansatz hinzugefügt. Bei Reihenversuchen empfiehlt es sich, die Sporensuspension mittels einer sterilen Pipette auf die einzelnen Kolben gleichmäßig zu verteilen (z. B. je 0,5—2 ccm pro Kolben).

d) Abernten reifer Conidiosporen. Die die Kulturen enthaltenden Agarröhrchen, die an den Glaswänden kein Kondenswasser enthalten sollen, werden bei der gleichen Temperatur (z. B. im Gärraum) mit sterilem Talkumpulver versetzt und mit dessen Hilfe werden die Sporen von der Oberfläche des Agarröhrchens abgestreift; bei 35° noch 2—3 Stunden in sterilen Gefäßen übertrocknet und in diesem Zustand aufbewahrt. Derartig aufbewahrtes Impfmateriel behält seine physiologischen Eigenschaften besser und konstanter als in Agarröhrchen².

47. Übung:

Herstellung von Massenkulturen und Trockenpräparaten.

a) Massenkultur von Schimmelpilzen zur Gewinnung von Oberflächenmycel. Die Nährlösung (z. B. Bierwürze von 8° Bllg. oder eine 10—15%ige Zuckerlösung mit Nährsalzen, vgl. S. 237) wird in einer größeren Anzahl großer FERNBACH-Kolben vor-

¹ Vgl. z. B. GREENE und GILBERT: Science (N. Y.) II, 75, 388 (1932); GREENE: Mycologia, (N. Y.) 25, 117 (1933).

² Vgl. dazu PALEY: Arch. f. Mikrobiol. 7, 206 (1936).

bereitet (und zwar bei solchen von 2 l Inhalt je 400—500 ccm, bei solchen von 5 l Inhalt je 1200—1500 ccm). Impfung mit einer Sporensuspension des betreffenden Pilzes. Nachdem ausreichendes Wachstum stattgefunden hat (bei 25—35°) werden die Pilzmycelien gesammelt und in einer Spindelpresse von anhaftender Flüssigkeit befreit, sodann zwecks weiterer Entfernung des Substrates wiederholt mit Wasser angeteigt und wieder abgepreßt¹. Man kann auch so vorgehen², daß die in einem großen Kolben befindliche sterile Nährlösung direkt mit der Sporensuspension versetzt wird und daß dann die ganze Lösung in trocken sterilisierte DRIGALSKI-Schalen (von etwa 20 cm Durchmesser) gleichmäßig in 1—2 cm Schichthöhe verteilt wird. Für 10 l Nährlösung verwendet man dabei Sporen von 3—4 ERLÉNMEYER-Kolben, in denen man den Pilz auf dem gleichen Substrat zur Entwicklung gebracht hat (Aufschwemmung der Sporen im Nährsubstrat durch gutes Umschütteln). Mit 10 l Nährlösung können etwa 70 Schalen von den genannten Dimensionen besetzt werden.

Zur Massenkultur von Schimmelpilzen in großem Maßstab im Laboratorium dienen eigene Apparate, die eine Züchtung der Pilze in großen Schalen ermöglichen. Das einfachste Arbeiten gestattet der von NORD beschriebene Sterilinkubator (vgl. S. 74).

b) Erzeugung von submersen Mycel nach der Schüttelmethode. Eine größere Anzahl von 500 ccm-ERLÉNMEYER-Kolben wird mit je 150 ccm Nährlösung (Zusammensetzung nach Bedarf) besetzt und dann wie in Übung 48 d (S. 240) vorgegangen. Nach 2 bis 4 Tagen usw. wird das Mycel abgesaugt und weiter verarbeitet.

c) Herstellung von Trockenpräparaten für enzymchemische Zwecke². Das gut abgepreßte und ausgewaschene Mycel (vgl. oben) wird in kleine Stücke zerschnitten oder zerbröseln und mit Alkohol-Äther (2 Volumteile Alkohol und 1 Volumteil Äther), Aceton oder Methanol übergossen. Für je 100 g trockengepreßtes Mycel verwendet man 2,5 l; nach 3—5 Minuten wird die Flüssigkeit abgossen und 100—300 ccm Äther zugefügt. Dieser Prozeß wird nach $\frac{1}{2}$ —1 Minute nochmals wiederholt. Ein Teil des anhaftenden Äthers wird dann rasch mittels Filtrierpapier entfernt und sodann das Material im Vakuumexsiccator 24 Stunden

¹ Falls die Entfernung von Reservestoffen des Mycels erforderlich ist (z. B. wenn das Mycel für enzymchemische Zwecke verwendet werden soll, läßt man die Mycelien vor dem Ernten nach dem Entfernen des Substrates auf Leitungswasser (dem man etwa 0,1% Citronensäure zusetzt) 2—6 Stunden hungern („verarmtes“ Mycel).

² Vgl. MÜLLER: In OPPENHEIMER und PINCUSSEN, Methodik der Fermente, S. 507, 510. Leipzig: Thieme 1929.

über Schwefelsäure getrocknet. Das Präparat wird schließlich pulverisiert und aufbewahrt oder weiter verarbeitet (z. B. zur Herstellung von Enzymextrakten usw.).

Anhang I: Theoretisches.

Insbesondere KLUYVER und PERQUIN¹ haben darauf hingewiesen, daß die bei der Oberflächenkultur entstehenden Pilzdecken Zellenmaterial von sehr heterogener Beschaffenheit besitzen. Die in den obersten Schichten befindlichen Zellen grenzen direkt an den Luftraum; dieselben sind daher mit Sauerstoff gut versorgt, dagegen sind sie hinsichtlich der Zufuhr von Nährstoffen von den unteren abhängig. Diese verhalten sich wieder umgekehrt. Bei den zwischen diesen äußersten Schichten liegenden Zellen sind dagegen alle Übergänge vorhanden. Es wird daher auch der Enzymgehalt und damit der Stoffwechsel der einzelnen Mycelzellen untereinander sehr verschieden sein.

Die Erzeugung von homogenem Zellmaterial ist nur durch submerse Kultivierung der Pilze möglich, also mittels der Schüttelmethode oder in der Gärtrommel (vgl. S. 79) oder mittels des Durchlüftungsverfahrens. Beim letzteren verwendet man Belüftungskolben oder ähnliche Geräte (vgl. S. 76 ff.), doch besteht dabei die Gefahr, daß bei längerer Versuchsdauer die porösen Platten zuwachsen. Für wissenschaftliche Versuche scheint die Schüttelmethode am zweckmäßigsten zu sein. Es bilden sich dabei gleichartige Mycelkügelchen im Inneren der Flüssigkeit. Insbesondere für enzymchemische Versuche sollte nur solches homogenes Zellmaterial verwendet werden.

Anhang II: Technische Erzeugung von Pilzmycel.

Asp. oryzae wird zur Erzeugung von „Taka-Diastase“ im großen auf Weizenkleie gezüchtet². Dieselbe wird mit 30–40% Wasser angefeuchtet und im Dampfstrom bis zur Verkleisterung der Stärke behandelt. Bei 40° werden Sporen des Asp. oryzae gut eingemengt und die Masse sodann in 3–5 cm dicken Schichten auf Zementdielen ausgebreitet; die Raumtemperatur soll etwa 25° betragen und die Luft mit Feuchtigkeit fast gesättigt sein. In der Masse findet beträchtliche Selbsterwärmung statt, die Temperatur soll aber nicht über 40° steigen. Die ganze Masse ist bald mit einem dichten Geflecht des Pilzmycels durchsetzt und wird nach 48 Stunden entfernt und gekühlt, sodann getrocknet („Taka-koji“). Das Produkt ist reich an verschiedenen Enzymen und wird technisch auf „Taka-Diastase“ verarbeitet.

48. Übung:

Die Gluconsäurebildung durch Schimmelpilze.

a) Analytische Versuchsreihe zur Auswahl geeigneter Pilze. Eine größere Anzahl 300 ccm-ERLENMEYER-Kolben (etwa 10–20, je nach der Anzahl der Pilzstämme), mit je 50 ccm folgender Nährlösung beschickt: 10% Glucose, 0,1% (NH₄)₂SO₄, 0,1%

¹ KLUYVER und PERQUIN: Bio. Z. 266, 68 (1933). — PERQUIN: Diss., Delft 1938.

² TAKAMINE: J. Soc. chem. Ind. 17, 118 (1898).

KH_2PO_4 , 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (in Leitungswasser); nach dem Sterilisieren je 2 Kolben (Parallelversuche) mit einer Sporensuspension verschiedener Pilzstämme (*Asp. niger*, *Penicillium*-arten usw.) geimpft (vgl. Übung 46 c, S. 235); nach ungefähr 3 Tagen (nachdem die entwickelte Pilzdecke die ganze Oberfläche völlig bedeckt hat) werden pro Kolben je 1,5 g CaCO_3 zugesetzt (bei etwa 130° in Eprovetten mit Wattestöpsel im Trockenschrank sterilisiert). Die Technik des Zusatzes ist folgende: Mittels des Sporns eines Einfülltrichters (vgl. Abb. 34) wird die Pilzdecke unter Drehen des Trichters so aufgehoben, daß das CaCO_3 , ohne das Mycel zu berühren, direkt in die Flüssigkeit hineingebracht werden kann. Nach weiteren 4—5 Tagen, wobei das CaCO_3 zeitweise durch vorsichtiges Umschwenken aufgerührt wird, ist der Prozeß in der Regel beendet. Versuche absterilisiert, Lösungen filtriert, Pilzdecken ausgepreßt, Filtrat aus je zwei Parallelversuchen vereinigt, mit Waschwasser auf 150 ccm aufgefüllt. Proben entnommen zur Bestimmung der restlichen Glucose (2—5 ccm), sowie des Ca-Gehaltes (5—10 ccm) in üblicher Weise (vgl. Übung 22 a, S. 160 sowie 44 a, S. 230). Der Vergleich der Ausbeute an Ca-Gluconat ergibt den geeignetsten Pilzstamm.

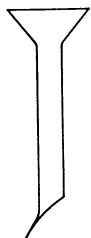


Abb. 34 Einfülltrichter.

*Bestimmung der Gluconsäure als Ca-Salz*¹. 10 bis 20 ccm der erhaltenen Lösung werden in einem kleinen Becherglas auf dem Wasserbad so weit eingedampft, daß die Flüssigkeit noch leicht beweglich bleibt. Dann setzt man so lange 96%igen Alkohol zu, als sich der entstehende Niederschlag in der Wärme eben noch auflöst. Nun läßt man in einem verschlossenen Gefäß (z. B. in einem leeren Exsiccator oder unter einer Glasglocke) 24 bis 48 Stunden in der Kälte stehen. Das Ca-Gluconat krystallisiert in Form blumenkohlartiger Aggregate ziemlich quantitativ aus. Man saugt auf einem Glasfilter (G 3) scharf ab, wäscht zunächst mit verdünntem, später mit starkem Alkohol, trocknet bei 80° und wägt. (Man erhält Ca-Gluconat mit 1 Krystallwasser.) Durch 24stündiges Stehenlassen des Filtrates überzeugt man sich davon, ob die Fällung vollständig war.

b) Gluconsäurebildung durch Enzympreparate („Glucoseoxydase“)². Die Erzeugung des Pilzmycels erfolgt in grundsätzlich

¹ BERNHAUER: *Bio. Z.* **172**, 305 (1926). — Vgl. dazu auch KARDO-SYSSOJEW: *Bio. Z.* **266**, 337 (1933) sowie PERQUIN: *Diss.*, Delft 1938.

² MÜLLER: *Bio. Z.* **199**, 136 (1928); vgl. auch die Zusammenfassung: *Erg. Enzymf.* **5**, 259 (1936). — FRANKE und LORENZ: *A.* **532**, 1 (1937).

analoger Weise wie in Übung 47. Zwecks Gewinnung des Sporenmaterials werden je 100 ccm Nährlösung in vier 300 ccm-ERLENMEYER-Kolben mit *A. niger* geimpft. Zusammensetzung der Nährlösung: 5% techn. Glucose, 0,075% Citronensäure, 0,2% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,025% KH_2PO_4 , 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,025% KCl und 3 Tropfen 1%ige FeCl_3 -Lösung (pro 100 ccm Nährlösung). Es wird in üblicher Weise sterilisiert und geimpft. Nachdem bei 32° gute Entwicklung und Sporenbildung stattgefunden hat, werden 10 l der gleichen, sterilen Nährlösung mit den Konidiosporen der vier ERLENMEYER-Kolben versetzt und auf 70 große Doppelschalen (von etwa 20 ccm Durchmesser) verteilt. Sobald bei 32° ein dichtes Mycel gebildet ist, aber noch bevor die Konidienbildung begonnen hat, wird die Nährlösung entfernt; man spült die Pilzdecken an der Unterseite mit Leitungswasser und läßt sie 4—6 Stunden bei der gleichen Temperatur auf der oben angeführten Nährlösung aber ohne Glucose hungern. Nochmalige gründliche Spülung der Pilzdecken mit Leitungswasser und Trockenpressen derselben in einer BUCHNER-Presse (10 l Kulturflüssigkeit geben 180—300 g Pilzmasse). Zerkleinern des Mycels mittels einer Fleischhackmaschine, zerreiben desselben (1 Teil) mit Quarzsand (1 Teil) und Kieselgur (0,35 Teile) in einem Mörser¹, bis das Ganze eine feucht-klebrige Konsistenz erhält. Abpressen unter Benutzung eines starken Preßtuches in einer hydraulischen Presse bei 300 Atm. Preßkuchen noch des öfteren mit etwa Wasser, Quarzsand und Kieselgur verrieben und immer wieder ausgepreßt.

Fällung der Preßsäfte in kleinen Anteilen: Je 30 ccm Preßsaft unter kräftigem mechanischem Rühren in ein Gemisch von 250 ccm 96%igem Alkohol und 125 ccm Äther eintropfen lassen. Sofortiges Absaugen der Fällung, Rückstand zweimal mit absolutem Alkohol gewaschen (noch bevor die Mutterlauge ganz abgesaugt ist) und schließlich mit Äther. Nach 24stündigem Trocknen des Präparates im Vakuum über Schwefelsäure ist dasselbe für die Versuche verwendbar. Die Aktivität des Enzympräparates bleibt monatelang fast unverändert. — Die Aktivitätsbestimmung des Enzympräparates erfolgt manometrisch in BARCROFT-WARBURG-Gefäßen bei 30° (vgl. auch S. 83).

c) Präparativer Versuch in Schalen (niedrige Flüssigkeitsschicht²). Eine Aluminiumschale (etwa 60×40×8 cm), die mit

¹ Nach MÜLLER (l. c.) verwendet man einen Mörser aus Gußeisen von 25 cm Höhe und 23 cm Durchmesser (Gewicht samt Pistill 14 kg).

² In prinzipiell gleicher Weise kann der Versuch in großen FERNBACH-Kolben durchgeführt werden.

einem aufhängbaren grobmaschigem Netz aus Aluminiumdraht versehen ist, wird nach dem gründlichen Ausspülen mit heißem Wasser mit 8 l der sterilisierten, noch heißen Nährlösung versetzt (Schichthöhe etwas über 3 cm). Die Nährlösung besteht aus 15—20% Rohrzucker, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% KH_2PO_4 und 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in Leitungswasser. Nach dem Erkalten impft man mit der Sporenmasse von zwei Kleinversuchen (je 50 ccm Nährlösung in 300 ccm fassenden ERLLENMEYER-Kolben) durch kräftiges Aufschütteln der Sporen im Nährsubstrat. Die Schale wird dann mit einem großen Bogen Filtrierpapier bedeckt, das mittels eines Gummibandes festgehalten wird. Nach 3—4 Tagen bei 30° ist das Mycel genügend stark entwickelt. Man setzt nun täglich in Portionen von je etwa 60 g insgesamt etwa 300—400 g CaCO_3 nach vorsichtigem Aufheben der Pilzdecke mittels des eingesetzten Netzes zu und rührt mit einem Glashaken gut um; nach dem Entweichen des CO_2 wird die Pilzdecke wieder aufgesetzt. Nach einer Gesamtdauer von etwa 6—10 Tagen ist der Prozeß beendet. Die Flüssigkeit wird abgehebert und die Pilzdecke mit einer neuen Zuckerlösung (ohne Nährsalze) unterschichtet. Der gleiche Prozeß kann noch zwei- bis dreimal wiederholt werden. Die verarbeiteten Lösungen werden durch Erhitzen unter eventuellem Zusatz von etwas Calciumhydroxyd völlig neutralisiert (Lackmus), filtriert und im Vakuum auf etwa 1—2 l verdampft. Nach längerem Stehen krystallisiert das Ca-Gluconat aus (manchmal auch bereits während der Vakuumverdampfung), es wird abgesaugt oder auf einer Siebzentrifuge abgeschleudert und sodann nach dem Anzeigen mit etwas Wasser auf einer Spindelpresse oder hydraulischen Presse abgepreßt. Umkrystallisieren aus heißem Wasser.

d) Gluconsäurebildung mittels der Schüttelmethode. *Gewinnung des Schüttelmycels:* Acht 500 ccm-ERLLENMEYER-Kolben werden mit je 150 ccm folgender Nährlösung in üblicher Weise beschickt: 20% Rohrzucker, 0,1% NaNO_3 , 0,0028% H_3PO_4 , 0,005% KCl , 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Zum Abschließen der Kolben dient ein Wattebausch, durch den noch ein Glasrohr von 8 cm Länge und 1 cm Durchmesser führt, das gleichfalls mit Watte verschlossen ist¹. Nach dem Sterilisieren wird mit je 1 ccm einer nicht zu dichten Sporensuspension eines *Aspergillus niger* Stammes mit gutem Gluconsäurebildungsvermögen geimpft. Zu diesem Zweck wird der Pilz in ERLLENMEYER-Kolben oder ROUX-Kolben von etwa 200 ccm Inhalt auf Bierwürzeagar (Malzagar) kultiviert und nach einer

¹ Dasselbe gewährt einen sicheren Gasaustausch, auch wenn der untere Wattebausch durchnäßt werden sollte.

Woche verwendet. Nach gutem Verteilen der Sporen in sterilem Wasser durch kräftiges Schütteln wird unter sterilen Bedingungen durch ein grobes Filter filtriert. Die so erhaltene Sporensuspension wird nun so weit verdünnt, daß nicht mehr als etwa 2—6 Millionen Sporen pro Kubikzentimeter vorhanden sind. Nach dem Impfen werden die Kulturen 48 Stunden (nicht länger!) auf einer Schüttelmaschine mit 80 Hin- und 80 Herbewegungen pro Minute bei etwa 30° belassen. Das Mycel wird dann unter sterilen Bedingungen gemeinsam auf einem groben Filter gesammelt und mit der Versuchslösung ausgewaschen.

Durchführung der Oxydation. Das so gesammelte Schüttelmycel wird nun nach dem Durchstoßen des Filters mit einem abflambierten Glasstab mit der Versuchslösung (10%ige Glucoselösung) in einen sterilen Kolben geschwemmt und das Ganze auf 500 ccm aufgefüllt. Nach gutem Aufschütteln entnimmt man eine Probe von 50 ccm und bestimmt darin die Menge an Myceltrockengewicht, indem man die Probe durch ein Jenaer Glasfilter G 3 scharf absaugt und zunächst gründlich mit destilliertem Wasser und dann zweimal mit je 10 ccm wasserfreiem Aceton und einmal mit trockenem Äther wäscht. Dies erfolgt in der Weise, daß die Waschflüssigkeit in das Glasfilter gebracht und nach 2 Minuten scharf abgesaugt wird. Nach einstündigem Trocknen bei 100° wird gewogen. Nun werden 4—6 sterile 500 ccm-ERLENMEYER-Kolben mit so viel Kubikzentimeter der Mycelsuspension versetzt, daß pro Kolben 150 mg Mycel vorhanden sind. Man fügt dann noch so viel sterile Glucoselösung zu, daß pro Kolben 150 ccm vorhanden sind. Schließlich setzt man noch je 5 g reines CaCO₃ zu. Die Kolben werden nun dauernd bei etwa 30° geschüttelt (wie oben). Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen wird je ein Kolben abgebrochen und in üblicher Weise aufgearbeitet (vgl. Übung a). Die Ausbeute an Ca-Gluconat ist nach 8 Tagen so gut wie quantitativ.

Anhang I: Theoretisches.

1. Erreger und Bedingungen der Gluconsäuregärung. Die Bildung von Gluconsäure ist für fast alle säurebildenden Aspergillaceen sowie auch für viele andere Mycelpilze charakteristisch. Die meisten Pilze bilden Gluconsäure insbesondere in Gegenwart von Calciumcarbonat, manche Pilze erzeugen aber auch in saurer Lösung fast nur Gluconsäure¹. Insbesondere diese sind für die technische Gluconsäureherstellung nach dem Oberflächenverfahren von Wichtigkeit (vgl. unten). Pilzdecken mit gutem Gluconsäurebildungsvermögen entwickeln sich besonders in Gegenwart von wenig Stickstoff,

¹ Vgl. MAY, HERRICK, MOYER und HELLBACH: Ind. Chem. **21**, 1198 (1929).

wobei auch nur geringe Mengen anderer Nährsalze anwesend sein sollen¹. Manche Pilze vermögen auch andere Aldosen zu den zugehörigen Aldonsäuren zu oxydieren, wie Mannose zu Mannonsäure, doch wurde dieser Vorgang erst relativ selten beobachtet.

2. Enzymchemie der Gluconsäuregärung. Bei der Bildung der Gluconsäure handelt es sich um eine einfache Oxydation der Glucose. Der Prozeß wird durch ein Enzym, die Glucoseoxydase katalysiert². Dieselbe konnte im Preßsaft von *A. niger*-Mycel nachgewiesen werden (vgl. oben). Sie ist spezifisch auf die Oxydation von Glucose, Mannose und Galaktose eingestellt. Die beiden letzteren werden allerdings mit geringerer Geschwindigkeit als Glucose oxydiert. — Nach neueren Untersuchungen³ gehört die Glucose-Oxydase — im Gegensatz zur Bezeichnung MÜLLERS — nicht zu den eigentlichen Oxydasen, da der Sauerstoff durch typische H₂-Acceptoren (wie Chinon oder Indophenolfarbstoffe) ersetzt werden kann. Von den eigentlichen Oxydasen unterscheidet sie sich auch durch ihre Unempfindlichkeit gegen Blausäure und andere schwermetallbindende Gifte. Unter aeroben Bedingungen konnte auch Hydroperoxyd quantitativ nachgewiesen werden. — Die Glucoseoxydase gehört wahrscheinlich zur Gruppe der oxytropen (also direkt mit O₂ reagierenden) Dehydrasen und müßte daher als Aero-Glucosehydrase bezeichnet werden (zum Unterschied von der Anaero-Glucosehydrase der Leber, während das betreffende Enzym der Essigbakterien eine Zwischenstellung einnimmt; vgl. S. 231).

Anhang II: Technologie der Gluconsäuregärung.

1. Darstellung von Gluconsäure nach dem Oberflächenverfahren. MAY, HERRICK, MOYER und HELLBACH⁴ beschrieben eingehend die Durchführung dieses Prozesses in halbtechnischem Maßstab. Die Vergärung wird in 20%iger Glucoselösung unter Zusatz von Nährsalzen in übereinander befindlichen flachen Aluminiumpfannen von je 1 qm Fläche mittels *Penicillium luteum purpurogenum* (ohne Zusatz von Säurebindungsmitteln) unter Einblasen von Luft (etwa 100 l per Minute) durchgeführt; Schichthöhe 3,3–4 cm. In einem Ansatz mit 7 Schalen wurden 315 l einer Lösung mit 20% technischer Glucose (63 kg) und den erforderlichen Nährsalzen in 11 Tagen verarbeitet, wobei die Ausbeute 37% d. Th. betrug.

2. Darstellung von Gluconsäure nach dem submersen Verfahren in der rotierenden Gärtrommel. Im Anschluß an Laboratoriumsversuche⁵ wurde ein technisches Verfahren zur Gluconsäureerzeugung mittels submerser Pilzmycel ausgearbeitet⁶. Bei demselben wird eine Gärtrommel von etwa 1500 l Gesamtfassungsvermögen aus Aluminium

¹ Näheres vgl. BERNHAUER: Die oxydativen Gärungen. Berlin: Julius Springer 1932.

² MÜLLER: Vgl. die zusammenfassende Darstellung in den Erg. Enzymforsch. 5, 259 (1936).

³ FRANKE und LORENZ: A. 532, 1 (1937).

⁴ HERRICK, HELLBACH und MAY: Ind. Eng. Chem. 27, 681 (1935). — MOYER, WELLS, STUBBS, HERRICK und MAY: Ebenda 29, 653, 777 (1937). 5) *Ind. + Eng. Chem.* 26, 575 (1934)

⁶ WELLS, LYNCH, HERRICK und MAY: Chem. and Met. Eng. 44, 188 (1937). — GASTROCK, PORGES, WELLS und MOYER: Ind. Eng. Chem. 30, 782 (1938).

von hohem Reinheitsgrad verwendet, die sich während der Gärung in Rotation um eine horizontale Achse befindet (10 Umdrehungen pro Minute). Man arbeitet unter Luftdurchleitung (ungefähr 200 l pro Minute, 300 ccm je l) bei einem Überdruck von etwa 2 Atm. Die Impfung erfolgt mittels vorgekeimter Sporen; die durch den oxydativen Prozeß bedingte Temperatursteigerung wird durch Wasserkühlung ausgeglichen. Nach 24 Stunden sind 500 l einer 15%igen Glucoselösung in Gegenwart von CaCO_3 und Nährsalzen praktisch quantitativ in Gluconsäure umgewandelt. Nach dem völligen Abneutralisieren mit Kalk wird das Ca-Gluconat in üblicher Weise gewonnen. Das beim Prozeß abfallende Mycel kann noch zu weiteren Umsetzungen verwendet werden.

49. Übung:

Die Kojisäurebildung.

a) Analytischer Versuch und Auswahl eines geeigneten Pilzes. In einer Anzahl von ERLÉNMEYER-Kolben von 300 ccm Inhalt werden je 100 ccm folgender Nährlösung vorbereitet¹: 15—20% Glucose², 0,1125% NH_4NO_3 , 0,0054% H_3PO_4 , 0,01% KCl und 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Temperatur etwa 30°. Man impft mit einer Sporensuspension von *Asp. flavus* (bzw. verschiedener anderer Stämme der *Asp. flavus*-Gruppe oder auch Pilze wie *Asp. oryzae*, *Awamori*, *candidus* u. a.). Vom 8. Tag an werden je zwei Versuche abgebrochen und analytisch aufgearbeitet: Bestimmung des Mycelgewichtes nach gründlichem Auswaschen und Trocknen bei 90°, Bestimmung des Zuckergehaltes und der Kojisäure.

Qualitative Prüfung auf Kojisäure: Die Kulturflüssigkeit gibt auf Zusatz von Eisenchloridlösung eine tiefrote Färbung.

Quantitative Bestimmung der Kojisäure: Eine aliquote Menge der Kulturflüssigkeit (etwa 20 ccm) wird mit n-Lauge neutralisiert und die Kojisäure durch Zusatz von n/10 Kupferacetatlösung als Cu-Salz ausgefällt, der Niederschlag bei 100° getrocknet und gewogen; Zusammensetzung des Niederschlages: $\text{Cu}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4)_2 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$. Das Filtrat kann dann aufgefüllt und in einem aliquoten Teil desselben die Zuckerbestimmung nach BERTRAND vorgenommen werden. (Kojisäure selbst reduziert auch FEHLINGSche Lösung, so daß die Zuckerbestimmung nach ihrer Ausfällung zu erfolgen hat.) Die Menge der gebildeten Kojisäure kann bis über 40% des verwendeten Zuckers (50—60% des verbrauchten Zuckers) ansteigen.

¹ Vgl. MAY, MOYER, WELLS und HERRICK: Amer. Soc. **53**, 774 (1931).

² Man kann ein technisch reines Produkt von etwa 90% Glucosegehalt verwenden.

b) Präparativer Versuch. In einem oder mehreren FERNBACH-Kolben von 2 l Inhalt werden je 400 ccm des gleichen Mediums wie bei a) mit einem geeigneten Pilzstamm von *Asp. flavus* geimpft, nach etwa 12 Tagen bei 30—35° wird der Versuch aufgearbeitet: Bestimmung des Gehaltes an Kojisäure in einem aliquoten Teil; der Rest wird mit Hilfe eines Flüssigkeitsextraktors erschöpfend mit Äther extrahiert; die nach dem Vertreiben des Äthers verbleibende Krystallmasse wird aus Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 152°

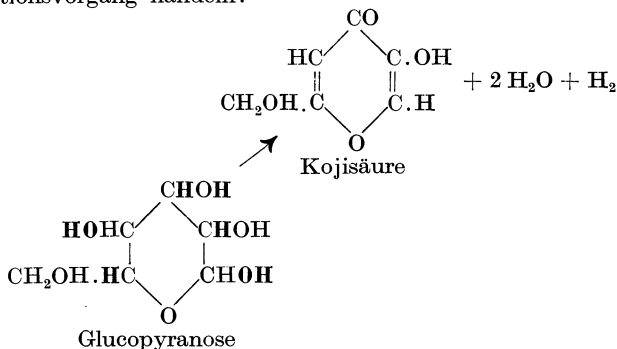
Anhang: Theoretisches.

1. Erreger der Kojisäuregärung sind die Pilze der *A. flavus-oryzae-tamarii*-Gruppe¹; diese scheinen zur Gluconsäuregärung nicht befähigt zu sein². Das Vermögen zur Kojisäurebildung ist direkt ein Test für die Zugehörigkeit eines Pilzes zur genannten Gruppe¹.

Das optimale pH für die Kojisäuregärung liegt zwischen 2,5 und 3,5³. Dabei bewährte sich eine relativ phosphatarmer Nährlösung.

2. Chemismus der Kojisäurebildung. Die Kojisäure wurde bei Pilzen auch aus anderen Hexosen wie auch aus Pentosen, Zuckeralkoholen, Triosen⁴ und Glycerin, sowie schließlich auch aus Äthanol erhalten. Bei der Bildung der Kojisäure aus diesen verschiedenen Substanzen könnten zunächst Hexosen synthetisiert werden, aus denen dann diese Säure entstehen würde⁵. Phosphorylierungen sind bei der Kojisäurebildung nicht beteiligt⁶.

Bei der Umwandlung von Glucose in Kojisäure könnte es sich um einen direkten, mit Dehydratationen verbundenen, einfachen Oxydationsvorgang handeln:



¹ BIRKINSHAW, CHARLES, LILLY und RAISTRICK: Phil. Trans. Roy. Soc. London **220**, B, 127 (1931).

² Nach MÜLLER [Erg. Enzymf. **5**, 270 (1936)] enthalten die Mycelien von *A. oryzae* keine „Glucoseoxydase“.

³ BARHAM und SMITS: Ind. Eng. Chem. **28**, 567 (1936).

⁴ Aus Dioxyceton wurden sogar die gleichen Ausbeuten an Kojisäure erhalten wie aus Glucose. KATAGIRI und KITAHARA: C. **1937**, II, 3616.

⁵ Vgl. KLUYVER und PERQUIN: Biochem. Z. **266**, 82 (1933).

⁶ GOULD: Bioch. J. **32**, 797 (1938).

Weiterhin ist von Interesse, daß die Kojisäure auch durch Essigbakterien gebildet werden kann, jedoch nur aus Mannit oder Fructose¹.

Wie leicht ersichtlich, muß dabei jedoch noch eine OH-Verschiebung stattfinden. — Versuche mit Enzympräparaten wurden noch in keinem Fall durchgeführt.

Anhangsweise sei auch noch darauf hingewiesen, daß durch Einwirkung verschiedener Pilze insbesondere von *Penicillium*arten auf Zuckerarten eine große Anzahl verschiedener Substanzen in meist relativ geringen Mengen gebildet werden. Dieselben stammen aus den verschiedensten Körperklassen; so gehören dazu einfache Phenolcarbonsäuren, Oxyterephthalsäuren, Oxyanthrachinone, Derivate der γ -Methyltetronsäure, ferner außer der Kojisäure verschiedene Ringsysteme mit Brückensauerstoff, sodann höhere Fettsäuren und schließlich auch chlorhaltige Stoffwechselprodukte². Alle diese Produkte entstehen auf Grund komplizierter Vorgänge synthetischer Natur, deren Chemismus noch ganz unaufgeklärt ist. Manche dieser Produkte dürften auch mit den Pilzfarbstoffen in Beziehung stehen.

B. Oxydative Säuregärungen der Schimmelpilze.

50. Übung:

Die Citronensäuregärung.

a) Auswahl von Citronensäurebildnern³. In einer größeren Anzahl von 300 ccm ERLÉNMEYER-Kolben je 100 ccm Nährlösung: 15% Rohrzucker, 0,2% NH_4NO_3 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,025% MgSO_4 ; nach dem Sterilisieren Zusatz von 1 ccm 2 n-HCl zu jedem Kolben (entsprechend einer $\frac{1}{50}$ normalen HCl, p_H 2,4—2,6). Je 2 bis 4 Parallelversuche für jeden Pilzstamm. Geimpft mit Sporensuspensionen verschiedener Pilzstämmen (insbesondere *Asp. niger*) auf Bierwürze-Agar. Pilze, die unter diesen Bedingungen (bei 32—34°) kräftiges Wachstum zeigen (bis zum 3. oder 4. Tag geschlossene Pilzdecke, bei ausreichender Impfung mit Sporen), werden für eine zweite gleichartige Versuchsreihe verwendet; bei dieser aber

¹ TAKAHASHI und ASAI: C. Bacter. II, 88, 286 (1933).

² Vgl. die Zusammenfassung von RAISTRICK: Erg. Enzymf. 7, 316 (1938); ferner in Perspectives in Biochemistry S. 263 (1938). — S. auch BIRKINSHAW: Biol. Reviews 12, 357 (1937).

³ Vgl. CURRIE: J. of biol. Chem. 31, 15 (1917). — BERNHAUER, DUDA und SIEBENÄUGER: Biochem. Z. 230, 475 (1931); BERNHAUER, BÖCKL und SIEBENÄUGER: Biochem. Z. 253, 37 (1932); BERNHAUER und IGLAUER: Biochem. Z. 286, 45 (1936). — Die oben beschriebene Nährlösung ist jedoch nicht die einzige, mit deren Hilfe eine Auswahl von Pilzstämmen mit gutem Citronensäurebildungsvermögen durchgeführt werden kann. So ist nach PERQUIN [Diss. Delft, S. 121 ff., (1938)] auch eine eisenfreie Nährlösung mit sehr wenig Phosphat dazu geeignet, wobei allerdings wieder andere Pilze als oben zur Auswahl kommen.

pro Kolben Zusatz von 1 ccm n/10 HCl (entsprechend einer $\frac{1}{1000}$ normalen Lösung, p_H 3,4). Untersuchung der Säurebildung: Entnahme von 2 ccm Probe vom 8. Tag an (sodann jeden zweiten Tag) und Titration mit n/10 Lauge. Pilze, bei denen 2 ccm Probe die Acidität auf etwa 30 ccm (und darüber) ansteigt, sind als gute Citronensäurebildner anzusehen, und für die Durchführung präparativer Versuche geeignet. 1 ccm n/10 Lauge = 6,4 mg Citronensäure (wasserfrei). Aufarbeitung: Parallelversuche vereinigt, filtriert und Analysen an Proben vorgenommen. Zuckerbestimmung an 2—5 ccm in üblicher Weise (nach BERTRAND vgl. S. 160).

Bestimmung der Citronensäure: Etwa 10 ccm der Kulturflüssigkeit werden bei Siedetemperatur mit einer Lösung von Calciumchlorid (etwa 10%ig) versetzt (dabei soll kein Niederschlag ausfallen: Abwesenheit von Oxalsäure), sodann wird zum Sieden erhitzt und Ammoniak zugefügt; die Flüssigkeit wird nun auf etwa $\frac{1}{3}$ eingekocht, wobei sie dauernd ammoniakalisch sein soll. Das Ca-Citrat scheidet sich krystallinisch aus und wird auf einem gewogenen Sinterglastiegel abgesaugt, zunächst mit siedendem Wasser gut ausgewaschen, schließlich mit 60%igem Alkohol nachgespült; nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz bei 130—135° erhält man krystallwasserfreies Ca-Citrat. 1 g Ca-Citrat = 0,843 g Citronensäure (+ H₂O) = 0,77 g Citronensäure (ohne H₂O).

Falls Oxalsäure vorhanden ist, so fällt man dieselbe vor der Citronensäurebestimmung durch Zusatz von Calciumchlorid in der Siedehitze aus, läßt 3—4 Stunden absitzen, filtriert, löst den Niederschlag in der gerade erforderlichen Menge verdünnter Salzsäure und fällt nochmals mittels Na-Acetat (Kongopapier!). Schließlich wird der Niederschlag in üblicher Weise in heißer verdünnter Schwefelsäure gelöst und die Lösung mit n/10-Permanganat titriert. 1 ccm n/10-KMnO₄ = 6,3 mg Oxalsäure (+ 2 H₂O) = 4,5 mg Oxalsäure (krystallwasserfrei).

Nach der Abtrennung des Ca-Oxalates und Ca-Citrates kann auch Ca-Gluconat abgeschieden und bestimmt werden (vgl. S. 238).

b) Präparativer Versuch. In einigen FERNBACH-Kolben von 5 l Inhalt werden je 1500 ccm Nährlösung [enthaltend 17,5—20% Rohrzucker, 0,2% NH₄NO₃ (oder 0,64% Mg(NO₃)₂ · 6 H₂O¹), 0,1% KH₂PO₄ und 0,025% MgSO₄ · 7 H₂O in Leitungswasser] nach dem Sterilisieren mit einer Sporensuspension eines gär-

¹ Vgl. BERNHAUER und IGLAUER: Bio. Z. 287, 153 (1936). — Statt Magnesiumnitrat kann auch bei Verwendung von Ammoniumnitrat als N-Quelle Magnesiumchlorid zugesetzt werden.

kräftigen *Aspergillus niger*-Stammes geimpft und bei etwa 30—32° belassen. Etwa vom 6. oder 8. Tag an werden je 2 ccm Probe nach gutem, aber vorsichtigem Umschwenken (bis zum Verschwinden der Schlieren) entnommen und mit n/10 Lauge titriert. Dies wird etwa alle 2 Tage wiederholt. Sobald das Säuremaximum erreicht ist, wird der Versuch abgebrochen.

Die Titrationswerte werden am besten in Kurvenform wiedergegeben (vgl. Abb. 35 und 36). Die beiden Abbildungen zeigen das unterschiedliche Verhalten zweier Pilzstämme gegenüber Magnesiumchlorid.

Während bei dem einen Pilzstamm die Gärung durch Zusatz desselben beschleunigt wird (Abb. 35, Kurve I), wirkt dieses Salz bei dem anderen hemmend (Abb. 36, Kurve I). Die Kurven II zeigen den Verlauf der Säuerung bei Verwendung von Ammonitrat als N-Quelle ohne Mg-Zusatz.

Aufarbeitung: Pilzdecken abgepreßt, Lösung filtriert und aufgefüllt. In einer Probe (10 ccm) wird die Citronensäure wie oben bestimmt. Der Rest der Lösung wird in einem Topf mit Calciumcarbonat allmählich, zum Schluß unter Erwärmen, neutralisiert und unter Zusatz eines kleinen

Überschusses schließlich längere Zeit im Sieden gehalten. Der Niederschlag wird heiß abgesaugt oder auf einer Siebzentrifuge abgeschleudert und zweckmäßigerweise in einer Presse von anhaftender Mutterlauge befreit. Sodann wird mit heißem Wasser

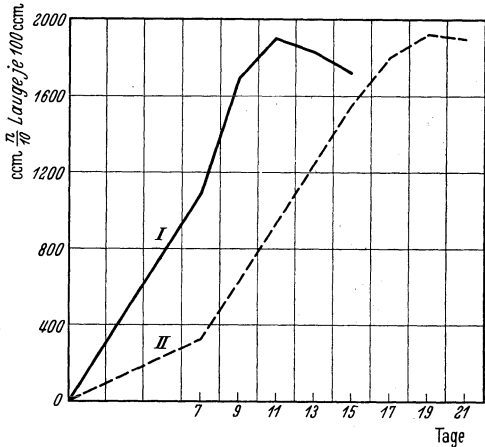


Abb. 35.

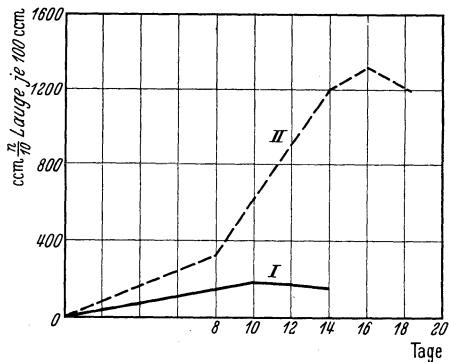


Abb. 36.

gewaschen, in Salzsäure gelöst und mit Tierkohle entfärbt. Das Filtrat wird in der Siedehitze in einem Topf allmählich unter ständigem Rühren mit Ammoniak versetzt, nach längerem Kochen wird das Produkt wieder wie oben gewonnen. Durch Einengen des Filtrates kann eine weitere Menge Ca-Citrat erhalten werden. Die in einer Presse möglichst trocken gepreßte Masse wird sodann auf freie Citronensäure verarbeitet: Behandlung mit der äquivalenten Menge verdünnter Schwefelsäure, Filtration, Nachwaschen mit Wasser, Verdampfung des Filtrates im Vakuum, Entfernung noch ausfallenden Calciumsulfats; schließlich wird verdampft und Krystallisieren gelassen.

Anhang I: Theoretisches.

1. Erreger der Citronensäuregärung sind vor allem die Aspergillaceen, wobei sich besonders *Aspergillus niger*-Stämme allen anderen überlegen erwiesen. Auch andere Pilze wie *Mucor piriformis* usw. vermögen jedoch Citronensäure zu bilden. Die individuellen Unterschiede hierin sind sehr groß, ohne daß aber bestimmte Beziehungen zwischen den morphologischen Eigenschaften der Pilze und deren Fähigkeit zur Säuerung mit Sicherheit erwiesen werden konnten. Von großer Bedeutung ist die Gewinnung von Stämmen mit gutem Citronensäurebildungsvermögen (vgl. dazu Übung 50 a). Die Säurebildner zeigen auch eine starke Variabilität des Gärvermögens und unterliegen bei fortgesetzter Laboratoriumszüchtung einer Art „Degeneration“, wobei das Vermögen zur Citronensäurebildung stark abgeschwächt wird oder verloren geht. Durch geeignete Maßnahmen gelingt es jedoch in der Regel wieder, eine Regenerierung desselben zu erzielen.

2. Die Bedingungen der Citronensäurebildung¹ sind recht kompliziert und noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Sobald gut säuernde Pilze gewonnen sind, ist vor allem die Ermittlung der günstigsten Bedingungen zur Züchtung eines Mycels mit dem besten Citronensäurebildungsvermögen von Wichtigkeit. Dabei verhalten sich die einzelnen Pilze recht verschieden. Maßgebend ist hier die Zusammensetzung der Nährlösung, die so beschaffen sein muß, daß die Mycelentwicklung eingeschränkt wird, indem gewisse Nährsalze im Minimum gehalten werden. Wichtig ist die Art und Menge der N-Quelle (etwa 0,05—0,08% N in der Lösung), ein gewisser Phosphatmangel (je nach der Art des Pilzes etwa 0,008—0,1% KH_2PO_4) sowie Sulfatmangel; Kalium und besonders Magnesium können meist in relativ großen Mengen vorhanden sein. Zink hatte bei manchen Pilzen günstigen, bei anderen ungünstigen Einfluß; Eisen ist bei manchen Stämmen ohne Einfluß, bei anderen wirkt es sehr ungünstig auf die Citronensäurebildung bzw. -anhäufung.

Der pH-Wert der Lösung muß meist recht tief gehalten werden (bis etwa 2), nur bei relativ schwachen Säurebildnern ist die An-

¹ Hinsichtlich der Literatur vgl. BERNHAUER im Handbuch der Enzymchemie von NORD und WEIDENHAGEN, Ak.Verlagsges. Leipzig, 1939.

wesenheit von CaCO_3 vorteilhaft. Dabei entstehen aber in der Regel zugleich größere Mengen Gluconsäure und Oxalsäure. — Als C-Quellen für die eigentliche Citronensäuregärung kommen vor allem Rohrzucker, Invertzucker und Glucose in Betracht, doch zeigen sich auch hier individuelle Unterschiede der Pilzstämme. Am günstigsten für die Säurebildung sind 17,5–20%ige Lösungen. — Für einen richtigen Verlauf der Citronensäuregärung ist eine rasche Entwicklung der Pilzdecken von Wichtigkeit, daher hat auch die Art der Impfung großen Einfluß auf die Eigenschaften des sich entwickelnden Mycels. Ferner ist eine richtige Beziehung zwischen Schichthöhe und Flüssigkeitsvolumen bei der Oberflächengärung sehr wichtig (vgl. dazu S. 76). Bei größeren Flächen muß für die Zufuhr steriler Luft gesorgt werden. — Bei Anwendung sehr niedriger Schichthöhen können die Pilzdecken 3–4mal zur Verarbeitung frischen Substrates verwendet werden. Die enzymatischen Fähigkeiten des Mycels zur Citronensäurebildung bleiben etwa 30–40 Tage erhalten.

Anhang II: Technologie der Citronensäuregärung.

Die Citronensäuregärung wird in großen, übereinander angeordneten flachen Schalen durchgeführt. Es werden 17,5–20%ige Rohrzuckerlösungen (oder Melasse), die die erforderlichen Salze enthalten bei 25–35° verarbeitet. Während des Prozesses muß für die Zufuhr steriler Luft gesorgt werden. Es sammelt sich freie Citronensäure bis zu einem Gehalt von 10–15% in der Lösung an. Zur geeigneten Zeit wird der Prozeß unterbrochen und die Säure mit Hilfe ihres Ca-Salzes abgeschieden und aus diesem die freie Citronensäure gewonnen. Von Wichtigkeit ist insbesondere die richtige Züchtung der Pilze und eine genaue Betriebskontrolle. Die Auswahl eines geeigneten Stammes ist zunächst von grundsätzlicher Bedeutung. Sodann müssen für diesen die geeignetsten Bedingungen zur Citronensäureproduktion aufgefunden werden, denn eine für alle Pilzstämme geeignete Nährlösung läßt sich nicht angeben, da dieselben große individuelle Unterschiede zeigen. Hinsichtlich der Durchführung der Citronensäuregärung in halbtechnischem Maßstab vgl. DOELGER und PRESCOTT¹. Die Gärung in Gegenwart von Kreide ist bei Anwendung des Oberflächenverfahrens technisch nicht durchführbar, da durch die CO_2 -Entwicklung die Pilzdecken abgehoben werden, was eine arge Störung des Prozesses bedingt; außerdem besteht dabei die Gefahr, daß zugleich Oxalsäure gebildet wird. Es kommt daher nur die Vergärung in saurer Lösung in Frage.

Der submerse Gärprozeß scheint sich bisher noch nicht bewährt zu haben, doch würde ein solches Verfahren zweifellos die Lösung des Problems der Citronensäureerzeugung vorstellen, da das bisher gebräuchliche Oberflächenverfahren mit erheblichen Bau- und Manipulationskosten sowie großem Raumaufwand und einer schwierigen Betriebsführung verbunden ist. (Vgl. dazu Technologie der Gluconsäuregärung, S. 242.)

¹ DOELGER und PRESCOTT: Ind. Eng. Chem. **26**, 1142 (1934). — Hinsichtlich sonstiger Angaben siehe WELLS und HERRICK: Ind. Eng. Chem. **30**, 255 (1938).

51. Übung:

Zwischenprodukte der Citronensäuregärung.

a) **Umwandlung von Ca-Acetat in Gegenwart von etwas Zucker**¹. Fünf ERLÉNMEYER-Kolben von 750 ccm Inhalt werden mit je 100 ccm einer Nährlösung von folgender Zusammensetzung beschickt: 4% Ca-Acetat, 0,5—1% Zucker, 0,2% NH_4NO_3 , 0,3% KH_2PO_4 und 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Nach dem Sterilisieren wird mit einer Sporensuspension eines geeigneten Pilzes geimpft und bei 29—30° stehen gelassen. Nach 10—14 Tagen werden die Versuche abgebrochen und vereinigt. Die Niederschläge und Mycelien werden abfiltriert und mit kaltem Wasser gründlich ausgewaschen. Die Lösung wird auf ein bestimmtes Volumen (etwa 600—800 ccm) aufgefüllt und aliquote Teile zur Bestimmung von Citronensäure, Zucker und Essigsäure verwendet (vgl. unten). Der Filtrerrückstand wird mit verdünnter Salzsäure behandelt, das ganze nochmals filtriert, das Pilzdeckengewicht in üblicher Weise ermittelt (Gesamtgewicht etwa 3—5 g) und das Filtrat auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Aliquote Teile des Filtrates verwendet man zur Bestimmung der Oxalsäure in üblicher Weise: Zusatz von Ammoniak zur siedenden Lösung, Filtration, Lösen des Niederschlages in 20%iger Schwefelsäure und Titration mit n/10 Kaliumpermanganat (1 ccm n/10 Permanganat entspricht 4,5 mg wasserfreier Oxalsäure = 6,3 mg Oxalsäure + 2H₂O) Durchführung der Bestimmungen im ersten Filtrat:

Bestimmung der Citronensäure (nach der Pentabromacetonmethode)². 50 ccm Probe werden mit 2 ccm Schwefelsäure und 1 ccm einer 40%igen Kaliumbromidlösung versetzt. Der Kolben wird in einem Wasserbad von 50° 10 Minuten lang erwärmt und dann sogleich mit 10 ccm einer 5%igen Kaliumpermanganatlösung in einem Guß versetzt (unterm Abzug, Bromentwicklung). Dann wird unter ständigem Umschwenken erkalten gelassen und falls keine Braunsteinabscheidung stattfand, eine weitere Menge Kaliumpermanganatlösung zugesetzt. Nach vollständigem Erkalten wird der ausgeschiedene Braunstein durch Zugabe einer ausreichenden Menge 20%iger Ferrosulfatlösung zersetzt und die Probe über Nacht im Kühlen (am besten Eiskasten) aufbewahrt. Das abgeschiedene Pentabromaceton wird dann durch einen Glasintertiegel filtriert, mit kaltem Wasser gut ausgewaschen und

¹ CHRZĄSZCZ und ZAKOMORNY: Biochem. Z. **285**, 340 (1936).

² Modifizierte Methode von KUNZ; nach FREY: Arch. f. Mikrobiol. **2**, 285 (1931); Titration nach KOMETIANI: Z. anal. Chem. **86**, 362 (1931).

in Alkohol gelöst. Die Flüssigkeit wird sodann mit Eisessig angesäuert, auf dem siedenden Wasserbad erwärmt und mit 5 ccm einer 20%igen alkoholischen Natriumjodidlösung versetzt. Man läßt noch 3—5 Minuten auf dem Wasserbad stehen, verdünnt nach dem Erkalten stark mit Wasser und titriert das ausgeschiedene Jod mit n/10 Natriumthiosulfatlösung in üblicher Weise. 1 ccm n/10 Natriumthiosulfatlösung entspricht 3,501 mg Citronensäure (+ 1 H₂O)¹.

Die Bestimmung eventuell noch vorhandenen Zuckers erfolgt in üblicher Weise nach BERTRAND. Zur Feststellung der noch unverbrauchten Essigsäure wird ein aliquoter Teil der Flüssigkeit (50—100 ccm) mit Schwefelsäure angesäuert und destilliert; Titration des Destillates ergibt die Menge an Essigsäure; 1 ccm n/10 Lauge = 6 mg Essigsäure.

Aus einem Ansatz von insgesamt 5 g Zucker und 20 g Ca-Acetat erhält man je nach der Art des verwendeten Pilzes etwa 2,5—4 g Mycel, etwa 2—3 g Citronensäure und gegen 1 g Oxalsäure, wobei zugleich gegen 50% des Ca-Acetates verbraucht werden.

b) Umwandlung von Calciumacetat in Gegenwart von etwas äpfelsaurem Natrium und Zucker². Grundansatz wie bei a; die Lösung enthält außer den Nährsalzen 4% Ca-Acetat, 0,5% Zucker und 0,5% Äpfelsäure (als Na-Salz). Weitere Durchführung des Versuches und Aufarbeitung wie unter a.

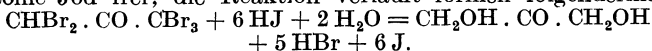
Aus einem Ansatz von insgesamt 2,5 g Zucker, 2,5 g Äpfelsäure und 20 g Ca-Acetat erhält man bei Verwendung eines guten Pilzes über 2 g Mycel, über 4 g Citronensäure, Spuren Oxalsäure, wobei über 40% des Ca-Acetates verbraucht sind.

Anhang: Zum Chemismus der Citronensäuregärung.

1. **Substrate der Citronensäurebildung.** Vor allem kommen hier die Hexosen Glucose und Fructose in Betracht, bzw. Rohrzucker und Invertzucker, ferner Maltose, in geringerem Ausmaße auch Mannose und Galaktose; sodann auch Arabinose, Xylose, Mannit, Glycerin, Triosen, Glycerinsäure, Gluconsäure, Zuckersäure, Muconsäure, Adipinsäure, Alkohol, Essigsäure, Glycolsäure, sowie eine Mischung von Äpfelsäure und Essigsäure, besonders in Gegenwart von etwas Zucker (vgl. oben).

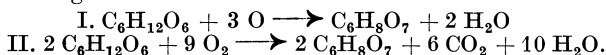
2. **Die Hauptvorstellungen über die Citronensäurebildung.** Die Bildung von Citronensäure aus derart verschiedenen Substanzen wie oben angeführt, macht die Annahme eines bestimmten Ausgangs-

¹ In der alkoholischen Pentabromacetonlösung werden durch HJ 6 Atome Jod frei; die Reaktion verläuft formell folgendermaßen:



² CHRZĄSZCZ und ZAKOMORNY: Biochem. Z. 285, 348 (1936).

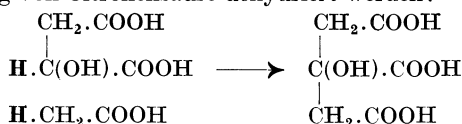
produktes, das primär aus allen genannten Substanzen entstehen kann erforderlich, und zwar wird bei der einen Gruppe von Vorstellungen der Citronensäurebildung angenommen, daß diese direkt aus dem Hexosemolekül gebildet wird (wobei also auch aus anderen Substanzen zunächst stets Hexose entstehen müßte), bei der anderen, daß zunächst alkoholische Gärung bzw. Bildung von Essigsäure stattfindet. Die Ausbeutezahlen müßten daher sehr verschieden sein, denn im ersten Falle könnte 1 Mol. Citronensäure aus 1 Mol. Hexose entstehen, im zweiten Fall 2 Mol. aus 3 Mol. Hexose, entsprechend den Gleichungen:



Im Fall I müßte die theoretische Ausbeute aus Hexosen 106,7% betragen, im Fall II 71,1% oder bezogen auf Rohrzucker 112,2% bzw. 74,9%. Die tatsächlich erreichten Ausbeutezahlen von etwa 89% der umgesetzten Glucose¹ sprechen daher für Gleichung I.

3. Die Vorstellungen über die direkte Umwandlung von Hexosen in Citronensäure sind allerdings noch durchaus nicht befriedigend und in keiner Weise bewiesen. So wurde angenommen, daß die Citronensäurebildung über Gluconsäure, Zuckersäure, Ketipinsäure führen könnte, oder über α , γ -Diketoadipinsäure und Spaltung dieser in Oxalessigsäure und Essigsäure mit einer nachfolgenden Kondensation dieser beiden Produkte unter Bildung von Citronensäure². — Ferner wurde auch angenommen, daß zunächst (ähnlich wie bei der Bildung von Bernsteinsäure durch Propionsäurebakterien erwogen) Zerfall des Zuckermoleküls unter Bildung von Bernsteinsäure und Acetaldehyd stattfinden könnte und daß dann ähnliche Umwandlungen einsetzen könnten wie unter 4. geschildert.

4. Die Vorstellungen über die Citronensäurebildung im Anschluß an eine alkoholische Gärung wurde unter Berücksichtigung der Tatsache, daß zahlreiche Aspergillaceen zur alkoholischen Gärung befähigt sind (vgl. S. 267), entwickelt. Es gelang ferner auch, unter der Einwirkung vorgezüchteter Pilzdecken auf Alkohol sowie auf Essigsäure Citronensäure zu erhalten³, ferner auch aus Äpfelsäure + Essigsäure in Gegenwart kleiner Mengen Zucker (vgl. oben). Gemäß dieser Vorstellung soll aus Essigsäure über Bernsteinsäure und Fumarsäure (vgl. S. 260) Äpfelsäure entstehen und diese gemeinsam mit Essigsäure unter Bildung von Citronensäure dehydriert werden:



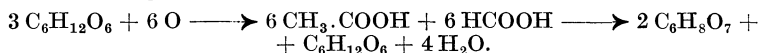
¹ BUTKEWITSCH und GAJEWSKAJA: C. r. Ak. Sc. USSR. (3) 8, 405 (1935). — WELLS, MOYER und MAY: Am. Soc. 58, 555 (1936).

² Vgl. dazu auch die rein chemische Bildung von Citronensäure aus Oxalessigsäure und Brenztraubensäure durch Oxydation des Reaktionsgemisches. KNOOP und MARTIUS: H. 242, 1 (1936).

³ CHRZASZCZ und Mitarbeiter: Bio. Z. 229, 343 (1930); 250, 254 (1932); 285, 340 (1936). — BERNHAUER und Mitarbeiter: Ebenda 240, 232 (1931); 253, 16 (1932).

Gegen die Vorstellung, daß die Citronensäurebildung im Anschluß an eine normale alkoholische Gärung erfolgt, sprechen jedoch einige wichtige Befunde. So geht der Citronensäurebildung unter normalen Bedingungen keine nachweisbare alkoholische Gärung voraus (zum Unterschied von der Fumarsäuregärung, vgl. S. 260), ein Zusammenhang zwischen zymatischer Aktivität und Citronensäurebildung wurde nicht aufgefunden¹. Ferner wird sie durch solche Mengen Jodessigsäure, die unter anaeroben Bedingungen die alkoholische Gärung durch den betreffenden Pilz völlig hemmen, in keiner Weise beeinflußt². Weiterhin wurden des öfteren viel größere Mengen Citronensäure beobachtet, als der Gärungsgleichung entsprechen würde, wenn die Citronensäurebildung eine primäre alkoholische Gärung zur Voraussetzung hätte (vgl. oben); auch die CO₂-Menge war weitaus geringer als in diesem Falle zu erwarten wäre. Schließlich wurde darauf hingewiesen³, daß die Befunde über die Bildung von Citronensäure aus Alkohol und Essigsäure usw. nicht einwandfrei seien, da die Möglichkeit der Citronensäurebildung aus Mycelsubstanzen nicht völlig ausgeschlossen wurde.

5. Vorstellungen über die Verknüpfung der Citronensäurebildung mit der Resynthese von Kohlehydraten. Die primären Stadien des Zuckerabbaus könnten bei der Citronensäurebildung die gleichen sein wie bei der alkoholischen Gärung oder Milchsäuregärung, es müßte aber dann nicht zur Entstehung von Alkohol kommen, sondern die Brenztraubensäure könnte unter Bildung von Essigsäure und Ameisensäure zerfallen. Die letztere könnte sodann einer Resynthese zu Kohlehydraten unterliegen⁴. Eine ähnliche Vorstellung wurde auch bei der Bildung von Äpfelsäure in grünen Pflanzen entwickelt⁵. Dabei müßte an eine gekoppelte Reaktion gedacht werden, etwa im Sinne der Gleichung:



Bekanntlich vermögen die Pilze auch auf den verschiedensten C-Quellen zu wachsen, ein Vorgang, der auch von einer Resynthese von Kohlehydraten begleitet sein muß, ohne daß es dabei aber zur Bildung von CO₂ kommt. Auch Säuren werden dabei ohne von CO₂-Entwicklung assimiliert⁵, wobei also die Carboxylgruppen reduziert werden müssen (vgl. auch die Verwirklichung solcher Reaktionen bei der Butanolgärung, S. 201). Insbesondere Glycolsäure, Äpfelsäure und Citronensäure werden durch Pilzkulturen rasch umgewandelt, ohne daß dabei CO₂ entsteht. Glycolsäure könnte dabei in Glycolaldehyd übergeführt und dieser zu Hexosen polymerisiert werden. Ferner wurde die Vorstellung entwickelt, daß Citronensäure und Äpfelsäure einer Hydrolyse unter Bildung von Glycolsäure unterliegen könnten:

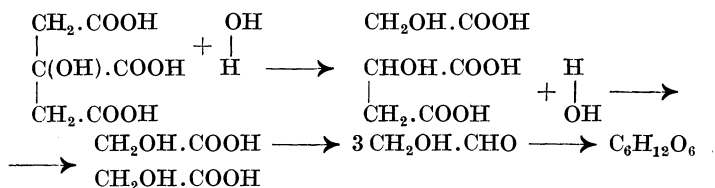
¹ TOMLINSON: *New Phytologist* **36**, 418 (1937).

² JOHNSON, KNIGHT und WALKER: *Bioch. J.* **31**, 903 (1937).

³ BUTKEWITSCH und Mitarbeiter: *Bio. Z.* **272**, 290, 364, 371 (1934); **276**, 446 (1935); *C. r. Ak. Sc. USSR.* (3) **12**, 427 (1936).

⁴ Vgl. BERNHAUER: *Bio. Z.* **274**, 111 (1934). — *Erg. Enzymf.* **3**, 185 (1934). — „Oxydative Gärungen“ im kurzen Hdb. d. Enzymchemie von NORD und WEIDENHAGEN, Akad. Verlagsges. Leipzig, 1939.

⁵ BENNET-CLARK: *New Phytologist* **32**, 128 (1933); **34**, 211 (1935).



In diesem Zusammenhang sei auch an die Resynthese von Glycogen aus Milchsäure im Muskel¹ und an den „oxydativen Anabolismus“ in höheren Pflanzen² erinnert.

52. Übung:

Die Fumarsäuregärung.

a) Analytische Versuchsreihe unter zeitlicher Verfolgung der Säurebildung³. In zwölf ERLÉNMEYER-Kolben von 2 l Inhalt werden je 300 ccm Nährlösung in üblicher Weise vorbereitet [10% technische Glucose⁴ mit 0,2% (NH₄)₂SO₄⁵]. Die Kolben werden mit einem Trichterrohr versehen, das durch den Wattebausch hindurchführt, und auch mit Watte verschlossen ist [ähnlich wie in Abb. 14 (S. 74), aber ohne das Absaugrohr]. Nach dem Sterilisieren wird in üblicher Weise mit einer Sporensuspension einer kräftigen Kultur von *Rhizopus nigricans* (gezüchtet auf Bierwürzeagar mit CaCO₃) geimpft. Nachdem sich bei 28—30° ein starkes Mycel entwickelt hat (etwa nach 4—6 Tagen), wird durch das Trichterrohr trocken sterilisiertes CaCO₃ (etwa 16—18 g) ohne Beschädigung der Pilzdecke eingefüllt⁶. Etwa am 9. oder 10. Tag werden die ersten Versuche abgebrochen und sodann in Intervallen von ungefähr 3 Tagen die weiteren, bis zum 24. Tag. Im Laufe des Versuches scheiden sich große Krystalle von Ca-Fumarat am Boden der Gefäße und an den Pilzdecken aus.

Aufarbeitung: Nach dem Absterilisieren der Versuche wird filtriert, die Pilzdecke von anhaftenden Krystallen befreit, gut ausgewaschen, ausgepreßt, getrocknet und gewogen. Die groben Ca-Fumaratkrystalle werden gesondert isoliert, mit Wasser gründlich abgeschwemmt, bei 100° getrocknet und gewogen, man erhält

¹ MEYERHOF, LOHMANN und MEIER: Bio. Z. 157, 459 (1925).

² BLACKMAN: Proc. Roy. Soc. B 103, 491 (1928).

³ Vgl. BERNHAUER und THOLE: Biochem. Z. 287, 167 (1936).

⁴ Enthaltend etwa 70—80% Reinglucose; dieselbe ist besser geeignet als ein reines Präparat.

⁵ Die übrigen Nährsalze sind in der technischen Glucose in ausreichendem Maße vorhanden.

⁶ Der Zusatz von sterilem CaCO₃ kann auch vor dem Impfen erfolgen. Die Mycelentwicklung ist zwar verlangsamt, die Säurebildung aber nicht vermindert.

Ca-Fumarat mit 3 Mol. Krystallwasser (1 g entspricht 0,558 g Fumarsäure). Der Rückstand (hauptsächlich Calciumcarbonat) wird mit Wasser in der Siedehitze erschöpfend extrahiert und das Filtrat mit dem Hauptanteil vereinigt. In diesem werden sodann nach dem Auffüllen an aliquoten Teilen die weiteren Analysen durchgeführt, und zwar Zucker- und Ca-Bestimmung in üblicher Weise und die Ermittlung der Säuren folgendermaßen:

Ein aliquoter Teil der Lösung (50—100 ccm) wird im Vakuum vollständig verdampft, der sirupöse Rückstand mit einer ausreichenden Menge 50%iger Schwefelsäure (dem Ca-Gehalt entsprechend) versetzt und unter Zusatz von frisch geglühtem Natriumsulfat zu einem trockenen Pulver verrieben, das dann in einem SOXHLET-Apparat mit Äther extrahiert wird. Nach etwa zwei- bis dreitägiger Extraktion ist auch die Äpfelsäure im Äther. Dieser wird sodann vollständig vertrieben und der Rückstand in Wasser aufgenommen; nach dem Auffüllen (auf 100—200 ccm, wegen der Schwerlöslichkeit der Fumarsäure) werden Proben zur Bestimmung der einzelnen Säuren entnommen.

*Bestimmung der Fumarsäure*¹. Ein aliquoter Teil der Lösung (etwa 10—50 ccm je nach der Fumarsäuremenge) wird mit so viel konzentrierter Salpetersäure versetzt, daß die Lösung 5% freie Salpetersäure enthält, und auf dem Wasserbad erhitzt, dann setzt man 25 ccm einer Lösung zu, die 10% Mercuronitrat und 7% Salpetersäure enthält. Nach ½stündigem Stehen auf dem Wasserbad hat sich die anfangs milchige Trübung in einen gut krystallisierten Niederschlag umgewandelt. Nach dem Erkalten kann sogleich durch ein Weißbandfilter filtriert werden, sodaß die Hauptmenge des Niederschlags im Kolben zurückbleibt. Man wäscht unter Dekantieren mit 5%iger Salpetersäure nach, und schließlich mit etwas Wasser. Das Filter wird in das Fällungsgefäß zurückgebracht, etwas starke Salpetersäure zugesetzt und etwa ½ Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Das Mercuriofumarat setzt sich um und Mercurinitrat geht in Lösung. Dann wird mit Wasser verdünnt und mit n/10 Ammoniumrhodanidlösung unter Anwendung von Eisenammoniumalaun² titriert. 1 ccm dieser Lösung entspricht 2,9 mg Fumarsäure.

¹ Modifizierte Methode von HAHN und HAARMANN, nach Versuchen mit SCHWIND, Diss. Prag 1936.

² Herstellung der Indicatorlösung: Eine bei Zimmertemperatur gesättigte Lösung von Eisenammoniumalaun wird mit konz. Salpetersäure bis zum Verschwinden der Braunfärbung versetzt. Man nimmt 1 ccm dieser Lösung für 25 ccm Flüssigkeit und titriert bis zum Farbumschlag (Verschwinden des grünlichen Farbtons; der Umschlag ist scharf).

*Bestimmung der Äpfelsäure*¹ durch Überführung in Fumarsäure. Ein aliquoter Teil der Lösung (etwa 50 ccm) wird mit Lauge neutralisiert (Phenolphthalein) und auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen (etwa 10 ccm) verdampft, in einen Silbertiegel gebracht und nach Zusatz von 10 g festem Ätznatron im Trockenschrank auf 130° bis zur Vertreibung des Wassers erhitzt und dann noch 3 Stunden. Nun wird in Wasser gelöst (etwa 50 ccm), mit stark verdünnter Salpetersäure neutralisiert (gegen Kongo) und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Eine Probe wird sodann mit so viel Salpetersäure versetzt, daß die Lösung 5%

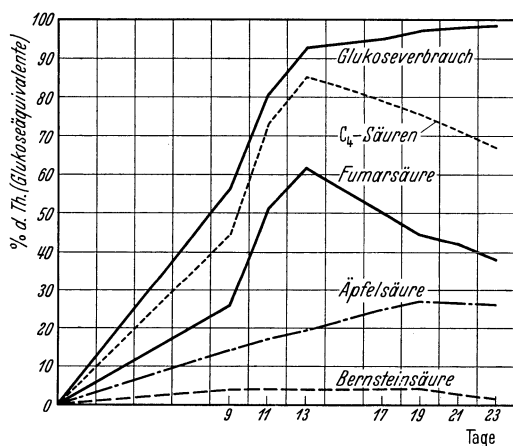


Abb. 37.

freie Salpetersäure enthält und die Bestimmung der Fumarsäure vorgenommen. Man erhält so die Summe der ursprünglich vorhandenen Fumarsäure und der aus der Äpfelsäure entstandenen; durch Abzug der wie oben bestimmten bereits vorhandenen Fumarsäuremenge vom hier erhaltenen Wert ergibt sich die der vorhandenen Äpfelsäure entsprechende Menge Fumarsäure. 1 g Fumarsäure entspricht 1,15 g Äpfelsäure.

Bestimmung der Bernsteinsäure. Ein aliquoter Teil der Lösung (etwa 50 ccm) wird mit Lauge neutralisiert (Phenolphthalein) und auf dem Wasserbad in einer Schale zwecks Zerstörung der Fumarsäure und Äpfelsäure mit 4%iger Kaliumpermanganatlösung so lange versetzt, bis die Rotfärbung $\frac{1}{4}$ Stunde lang erhalten bleibt. Dann wird der Braunstein durch Einleiten von SO₂ gelöst,

¹ HAHN und HAARMANN: Z. f. Biol. 87, 107 (1928); 89, 159 (1929).

nach Zusatz einiger ccm 50%iger Schwefelsäure (bis zur schwach kongosauren Reaktion) das SO_2 auf dem Wasserbad vertrieben, die Lösung auf ein kleines Volumen verdampft und der Rückstand mit so viel frisch geglühtem Natriumsulfat verrieben, daß ein trockenes Pulver entsteht, das im SOXHLET-Apparat extrahiert wird. Der Rückstand nach dem Abdampfen des Äthers wird mit n/10 Lauge neutralisiert (gegen Phenolphthalein, dann Zusatz von einem Tropfen verdünnter Salpetersäure), sodann wird bernsteinsaures Silber durch Zusatz von n/10 Silbernitratlösung ausgefällt, und das überschüssige Silber mittels n/10 Ammoniumrhodanidlösung nach VOLHARD zurücktitriert. 1 ccm n/10 Silbernitratlösung entspricht 5,8 mg Bernsteinsäure.

Aus dem Versuch wird der allmähliche Anstieg der Fumarsäuremenge bis zu einem Maximum von 40–60% der Theorie ersichtlich, sodann findet wieder ein Abfall der Fumarsäuremenge statt, die Äpfelsäure steigt bis zu einem Maximum von etwa 20–30% an, das allerdings wesentlich später erreicht wird als bei der Fumarsäure, die Menge an Bernsteinsäure bleibt dauernd relativ gering und zwar etwa 4–6% d. Th. (vgl. Abb. 37).

b) Präparativer Versuch¹. Man benützt einige FERNBACH-Kolben von 2 l Inhalt (versehen mit einem weiten Trichterrohr zum Einfüllen von CaCO_3 sowie zur Probeentnahme und einem dünnen Rohr zur konstanten Belüftung des Gasraumes oberhalb der Pilzdecken). Käufliche Kartoffelstärke wird nun in Portionen zu je 100 g in 500 ccm Leitungswasser aufgeschwemmt und in eine siedende Lösung von je 3 g konzentrierter Salzsäure oder 2,1 g konzentrierter Schwefelsäure in 400 ccm Wasser allmählich eingetragen, wobei das Gemisch dauernd im Sieden gehalten wird (20–30 Minuten). Es bildet sich zunächst Stärkekleister, dann findet Klärung statt. Schließlich wird noch 45 Minuten im vorgeheizten Autoklaven auf 133° (2 Atm.) erhitzt. Man kocht dann nach Zusatz von wenig CaCO_3 auf und filtriert ab oder man stellt durch Zusatz von Soda oder Pottasche auf den pH-Wert 6,2 ein. Dann wird jede Portion auf 1000 ccm aufgefüllt und mit 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt². Jeder Kolben erhält nun je 400 ccm dieser Lösung. Nach dem Sterilisieren impft man in üblicher Weise wie unter a). Auch im übrigen geht man wie dort vor. Der CaCO_3 -Zusatz erfolgt zwischen dem 4. und 8. Tag (je nach der Pilz-

¹ Nach Versuchen von H. LAHODA. — TAKAHASHI und SAKAGUCHI [J. Agr. Chem. Soc. Japan 1, Nr 10 (1925)] beschrieben die Gewinnung von Fumarsäure durch Einwirkung eines Rhizopus-Stammes auf Stärke direkt. Es haben jedoch nicht alle Rhizopusarten ein ausreichendes Stärkeverzuckerungsvermögen.

² Die anderen Nährsalze sind in ausreichender Menge vorhanden.

entwicklung). Die Abscheidung von Ca-Fumarat beginnt zwischen dem 8. und 11. Tag. Der Versuchsabbruch erfolgt in dem Zeitpunkt, in dem nur noch relativ wenig reduzierende Substanz vorhanden ist, wie durch Probeentnahmen und quantitative Zuckerbestimmung festgestellt wird (zwischen dem 12. und 18. Tag). Alle Versuche werden dann absterilisiert und vereinigt, Pilzdeckengewicht wie oben ermittelt, Ca-Fumaratkrystalle gesammelt und durch Abspülen gereinigt. Die Lösung wird auf ein kleines Volumen verdampft, wobei weitere Mengen Ca-Fumarat auskrystallisieren, die abgesaugt und gewaschen werden. Die Ausbeute an Ca-Fumarat beträgt bei Verwendung eines guten Pilzes in der Regel etwa 50% d. Th., kann aber auch bis 70% ansteigen. — Gewinnung der freien Fumarsäure: Das vereinigte Ca-Fumarat wird unter Anwendung eines großen Überschusses verdünnter Salzsäure in der Hitze gelöst, beim Erkalten krystallisiert freie Fumarsäure aus. Schmelzpunkt nach Umkrystallisieren aus Wasser 286°. Aus der salzsauren Mutterlauge kann durch Ausäthern am Flüssigkeitsextraktor noch eine weitere Menge Fumarsäure gewonnen werden. Aus der ursprünglichen Mutterlauge erhält man nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure durch Extraktion mit Äther neben etwas Fumarsäure vor allem Bernsteinsäure. Äpfelsäure kann nach dem Verdampfen der wäßrigen Lösung im Vakuum durch Ätherextraktion des mit geglühtem Natriumsulfat behandelten Rückstandes im SOXHLET-Apparat gewonnen werden.

Anhang: Theoretisches.

1. Erreger der Fumarsäuregärung. Mit Ausnahme des *A. fumaricus* kommen als Erreger der Fumarsäuregärung nur die Rhizopusarten in Betracht, und zwar vermögen besonders Stämme des *Rh. nigricans* größere Mengen Fumarsäure zu erzeugen. — Im allgemeinen sind zwei Gruppen von Rhizopusarten zu unterscheiden, und zwar bilden die Vertreter der einen Gruppe hauptsächlich Milchsäure, die der anderen vornehmlich Fumarsäure. [Die Fähigkeit zur Milchsäurebildung ist manchmal recht stark (besonders bei *Rh. oryzae*-Stämmen)¹, so daß sogar eine technische Erzeugung von Milchsäure mittels Pilzen in Frage käme, noch dazu, da dabei nur die im tierischen Körper wertbare d-Form gebildet wird.]

2. Bedingungen der Fumarsäuregärung. Von entscheidender Bedeutung ist hier der pH-Wert der Lösung, denn nur bei Abstumpfung der entstehenden Säure mittels CaCO₃ können größere Mengen Fumarsäure erhalten werden². Weiterhin ist die N-Quelle von Bedeutung, denn Rhizopusarten können nur in Gegenwart von Ammon-

¹ Vgl. LOCKWOOD, WARD und MAY: J. Agr. Res. 53, 849 (1937). — SELMAN, WAKSMAN und HUTCHINGS: Am. Soc. 59, 545 (1937).

² BUTKEWITSCH: Biochem. Z. 182, 99 (1927). — BUTKEWITSCH und FEDOROFF: Ebenda 206, 440 (1929).

salzen oder organischem N gedeihen, während sie Nitrat-N nicht zu verwerten vermögen (im Gegensatz zu den Mucorarten im engeren Sinn)¹. Die N-Menge muß auch hier beschränkt sein (etwa 0,2–0,3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)², ebenso die Phosphatmenge (etwa 0,05% KH_2PO_4). — Als C-Quelle kommt für *Rh. nigricans* insbesondere Invertzucker und Glucose in Betracht, da derselbe Rohrzucker nicht zu spalten vermag. Auch Stärke kommt bei Pilzen mit reichlichem Amylasegehalt in Frage (vgl. oben).

Die technische Verwertung der Fumarsäuregärung ist bisher noch nicht verwirklicht worden. Dabei dürfte die Oberflächengärung besondere Schwierigkeiten bieten, da in Gegenwart von CaCO_3 gearbeitet werden muß. Andererseits ist noch kein geeignetes submerses Verfahren ausgearbeitet, da unter diesen Bedingungen vornehmlich Milchsäure entstehen soll³. Vgl. Nachtrag.

53. Übung:

Zwischenprodukte der Fumarsäuregärung.

a) Umwandlung von Alkohol⁴. In zwei oder mehreren 2 l fassenden ERLÉNMEYER-Kolben werden Pilzdecken ebenso wie in Übung 52a 6–8 Tage zur Entwicklung gebracht, dann wird die Kulturflüssigkeit abgehoben, durch Nachspülen mit physiologischer Kochsalzlösung vollständig entfernt und durch je 300 ccm einer neuen Nährlösung folgender Zusammensetzung ersetzt: 2% Äthylalkohol, 0,05% NH_4NO_3 , 0,2% KH_2PO_4 , 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,3% NaCl ; weiterhin werden durch das Trichterrohr je 10 g CaCO_3 zugesetzt. Etwa alle 4–5 Tage fügt man die 1% Alkohol entsprechende Menge hinzu (pro Versuch daher 3 g Alkohol), so daß schließlich je Versuch insgesamt etwa 15–18 g Alkohol zugesetzt sind. Nach dem letzten Zusatz läßt man die Kolben noch etwa 6–8 Tage bei 28–30° stehen und bricht dann die Versuche ab. Während der Verarbeitung des Alkohols findet weitere beträchtliche Mycelentwicklung statt. Es krystallisiert hier kein Ca-Fumarat aus, da die gebildete Menge relativ klein ist, dagegen scheidet sich Ca-Oxalat ab.

Analyse der Kulturen wie in Übung 52a: Bestimmung des Mycelgewichtes und der ätherlöslichen Säuren, ferner des Ca-Gehaltes der Lösung, des verbrauchten Alkohols und der eventuell vorhandenen Essigsäure (durch Ansäuern, Dampfdestillation und Titration des Destillates, vgl. S. 127). Die im

¹ LOCKWOOD: *Mycologia* 28, 542 (1936).

² BUTKEWITSCH: *Biochem. Z.* 182, 99 (1927). — BUTKEWITSCH und FEDOROFF: *Ebenda* 206, 440 (1929).

³ Vgl. KANEL: *Mikrobiologia (USSR.)* 4, 636 (1935).

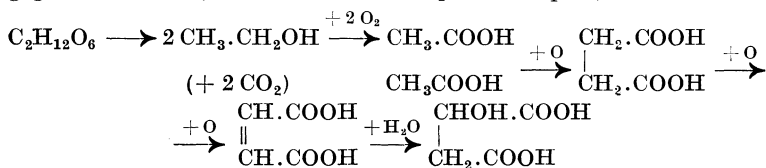
⁴ In Anlehnung an BUTKEWITSCH und FEDOROFF: *Biochem. Z.* 219, 103 (1930).

Niederschlag befindliche Oxalsäure wird in folgender Weise bestimmt: Der Rückstand wird in verdünnter Salzsäure gelöst, filtriert und das Filtrat aufgefüllt; in einem aliquoten Teil bestimmt man dann die Oxalsäure durch Zusatz von Ammoniak usw.

b) Umwandlung von Essigsäure¹. Züchtung einiger Pilzdecken und Vornahme der Versuche wie unter a. Die zweite Kulturflüssigkeit besteht aus 4% Essigsäure (als Ca-Acetat), unter Zusatz der gleichen Salze wie oben. Nach etwa 10, 20 und 30 Tagen werden die Versuche abgebrochen; Bestimmung der unverbrauchten Essigsäure und der ätherlöslichen Säuren wie zuvor. Man erhält dabei hauptsächlich Bernsteinsäure (10—14%).

Anhang: Zum Chemismus der Fumarsäuregärung.

Die Fumarsäurebildner verursachen auch im normalen Stoffwechsel, also unter aeroben Bedingungen stets zunächst eine alkoholische Gärung des Zuckers (vgl. Übung 56 S. 265). Der Alkohol, der sich bis zu etwa 2% in der Lösung anhäuft, verschwindet wieder, wobei Säuren auftreten¹. Es erscheint daher eine Beziehung zwischen der zunächst stattfindenden alkoholischen Gärung und der Fumarsäurebildung naheliegend. Es konnte auch Alkohol selbst zu etwa 10% in Bernsteinsäure und Fumarsäure umgewandelt werden¹ und ebenso entstand aus Ca-Acetat unter der Einwirkung der Pilzdecken von *Rh. nigricans* ein Gemisch von Bernsteinsäure und Fumarsäure, das etwa 18—30% der umgesetzten Essigsäure ausmachte². Während jedoch in den Zuckerkulturen oder bei der Umwandlung von Alkohol das Verhältnis von Fumarsäure:Bernsteinsäure wie 9:1 oder 8:2 war, überwog in den Acetatversuchen weitaus die Menge der Bernsteinsäure. Bei der Einwirkung der Pilzdecken auf Bernsteinsäure wurde keine Fumarsäure gebildet, wohl aber in Gegenwart von Invertzucker. Auch in Acetatversuchen überwog in Gegenwart von Invertzucker sofort die Menge der Fumarsäure. Es scheint daher ein aus dem Zuckerabbau (oder aus der Alkoholumwandlung) stammender H₂-Acceptor (vielleicht Acetaldehyd) für die Dehydrierung der Bernsteinsäure erforderlich zu sein. Die bei der Fumarsäuregärung vor sich gehenden Reaktionen können durch folgendes Schema wiedergegeben werden (bei Annahme von O₂ als Acceptor):



Daraus ergibt sich folgende Gesamtgleichung für die Fumarsäuregärung:



¹ BUTKEWITSCH und FEDOROFF: *Biochem. Z.* **219**, 103 (1930).

² BUTKEWITSCH und FEDOROFF: *Ebenda* **207**, 302 (1929); **219**, 87 (1930).

Die maximale Ausbeute an Fumarsäure würde daher 64,5% des umgesetzten Zuckers (Glucose oder Invertzucker) betragen. Unter Berücksichtigung dieses Schemas betrug die bisher erreichte Höchstausbeute an C₄-Säuren (Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure) etwa 90% d. Th.¹

54. Übung:

Die Oxalsäuregärung.

a) Analytische Versuchsreihe (unter zeitlicher Verfolgung der Säurebildung). In acht ERLÉNMEYER-Kolben von 300 ccm Inhalt je 100 ccm Nährlösung: 15% Rohrzucker, 0,2% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,025% MgSO₄ · 7 H₂O. Mit Sporensuspension von *Aspergillus niger* in üblicher Weise geimpft. Nach etwa 4 Tagen bei 30—35° (Pilzdecken völlig geschlossen) Zusatz von 10 g NaHCO₃ und 5 g Na-Acetat pro Versuch; weiter etwa 8—10 Tage belassen. Abbruch von je zwei Kolben am 8., 10., 12. und 14. Tag. Aufarbeitung: Mit Essigsäure neutralisieren, erhitzen, filtrieren (je zwei Parallelversuche gemeinsam), waschen und auf 250 ccm auffüllen. Ermittlung des Restzuckers in üblicher Weise (2—5 ccm Probe). Bestimmung der Oxalsäure (etwa 10 ccm Probe): Fällung mit Calciumchlorid und Titration des in Schwefelsäure gelösten Niederschlages mit Kaliumpermanganat. 1 ccm n/10 KMnO₄ = 6,3 mg Oxalsäure (+ 2 H₂O) = 4,5 mg Oxalsäure (krystallwasserfrei).

b) Präparativer Versuch. In einem 5 l-FERNBACH-Kolben 1 l Nährlösung (wie zuvor); weitere Behandlung wie zuvor. Zusatz von 100 g NaHCO₃ und 50 g Na-Acetat. Probeentnahme wie in Versuch 52 b, vom 8. Tag an täglich. Aufarbeitung: Mit Essigsäure neutralisieren, Filtrat mit Bleiacetat fällen, Niederschlag absaugen, auswaschen, in etwas Wasser suspendieren, Schwefelwasserstoff einleiten, Bleisulfid abfiltrieren, Filtrat am Wasserbad verdampfen; Krystallisation der Oxalsäure; aus Wasser umkrystallisieren. Fp. 100° (krystallwasserhaltiges Produkt).

Anhang: Theoretisches.

1. Als Gärungserreger kommen hier so gut wie alle *Aspergillaceen* in Frage; in geringerem Maße vermögen auch die *Mucoraceen* sowie viele andere Pilze Oxalsäure zu bilden. Insbesondere *Aspergillus niger*-Stämme sind zur Oxalsäurebildung befähigt, aber auch *Penicillium*-arten, wie das *Pen. oxalicum* u. a. (Hinsichtlich Hefen vgl. S. 268).

2. Bedingungen der Oxalsäurebildung. Von großem Einfluß ist auch hier der pH-Wert der Lösung. Ohne Neutralisationsmittel ist die Oxalsäurebildung bei den meisten Pilzen gering. Insbesondere in Anwesenheit freier anorganischer Säuren tritt in der Regel keine Oxal-

¹ BERNHAUER und THOLE: Biochem. Z. 287, 167 (1936).

säure auf¹. Dagegen werden in Gegenwart von CaCO_3 reichliche Mengen derselben gebildet. Ähnlich wirkt auch tertiäres Ca-Phosphat. Besonders reichlich findet aber Oxalsäurebildung aus Zucker in alkalischer Lösung statt, so besonders in Gegenwart von sekundärer oder tertiärer Na- oder NH_4 -Phosphat^{1, 2}. — In Abwesenheit von Neutralisationsmitteln ist die Art der N-Quelle von großem Einfluß auf die Oxalsäurebildung, da die bei Anwendung von physiologisch sauren N-Quellen freiwerdende Mineralsäure die Oxalsäurebildung so gut wie völlig hemmt. Besonders reichliche Oxalsäurebildung findet daher in Gegenwart von physiologisch alkalischen N-Quellen statt, besonders in Gegenwart von Pepton oder von Aminosäuren³.

55. Übung:

Die Oxalsäurebildung aus Zwischenprodukten.

a) **Umwandlung von Natriumacetat in Oxalsäure.** In einigen ERLENMEYER-Kolben werden in gleicher Weise wie in Übung 54 a Pilzdecken zur Entwicklung gebracht. Nach etwa 4—5 Tagen bei 30—35° wird die Nährlösung entfernt, durch Nachspülen mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und durch eine neue Nährlösung folgender Zusammensetzung ersetzt (je 50 ccm): 5,6% Natriumacetat (entsprechend 2,5% Essigsäure). Zwischen dem 7. und 10. Tag der Pilzdeckeneinwirkung werden die Versuche abgebrochen und analysiert. Bestimmung des Mycelgewichtes; Auffüllen des Filtrates und Bestimmung der Oxalsäure an 5—10 ccm in üblicher Weise.

Die Versuche werden zweckmäßigerweise mit verschiedenen *Aspergillus niger*-Stämmen durchgeführt, um so den geeignetsten Pilz zu ermitteln. Dabei kann auch gleichzeitig das Vermögen der Pilze zur Bildung von Glycolsäure und Glyoxylsäure festgestellt werden⁴. Zur Prüfung auf diese Säuren entnimmt man von Zeit zu Zeit 1—2 ccm Probe und geht dann in folgender Weise vor:

Prüfung auf Glycolsäure (Kodein-Reaktion): 1 ccm der Probe wird mit konzentrierter Schwefelsäure bis zum Entweichen kleiner Gasblasen erhitzt. Nach Zusatz eines Tropfens einer 5%igen alkoholischen Kodeinlösung findet Gelbfärbung statt, die in Violett übergeht.

Prüfung auf Glyoxylsäure (Pyrogallol-Reaktion): 1 ccm Probe wird mit 1%iger Pyrogallol-Schwefelsäure versetzt. Tiefblaue

¹ WEHMER: Ber. D. Bot. Ges. 9, 218 (1891). — Bot. Ztg. 49, 233 (1891). — A. 269, 383 (1892). — C. Bact. II 3, 102, 147 (1897).

² TSCHESSOKOV: Mikrobiol. (USSR.) 1, 390 (1932).

³ CHRZĄSZCZ und TIUKOW: Biochem. Z. 218, 73 (1930).

⁴ CHALLENGER, SUBRAMANIAM und WALKER: Soc. 1927, 200. — BERNHAUER und SCHEUER: Biochem. Z. 253, 11 (1932).

Färbung beim Erwärmen. Auf Wasserzusatz carminrot, durch Zugabe von Schwefelsäure wieder blau¹.

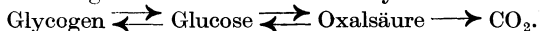
b) Umwandlung von Na-Succinat in Oxalsäure. Man geht genau so vor wie unter a), nur daß an Stelle von Na-Acetat eine Na-Succinatlösung verwendet wird, die 2,5% an Bernsteinsäure enthält.

c) Umwandlung von Ca-Fumarat unter Bildung von Ameisensäure, Glyoxylsäure und Oxalsäure². Man geht in der gleichen Weise wie unter a) oder b) vor, nur daß man eine 1%ige Fumar säurelösung und CaCO_3 verwendet. Nach etwa 10–12tägiger Einwirkung der Pilzdecken werden die Versuche abgebrochen und in gleicher Weise wie oben aufgearbeitet. Prüfung auf Glyoxylsäure und Bestimmung der Oxalsäure wie oben. Prüfung und Bestimmung von Ameisensäure wie in Übung 27 b (S. 180).

Anhang: Zum Chemismus der Oxalsäuregärung.

Der Verlauf der Oxalsäurebildung scheint völlig verschieden zu sein, je nachdem ob der Prozeß in sauer oder alkalischer Lösung vor sich geht.

1. Oxalsäurebildung in saurer Lösung findet nur durch gewisse Pilze statt. Dabei entsteht die Oxalsäure nur aus Zuckerarten (Glucose, Fructose, Galaktose, Arabinose, Xylose) sowie Gluconsäure. Andere organische Säuren geben keine Oxalsäure, sondern erwiesen sich bei Zusatz zu Zuckerlösungen sogar hemmend (insbesondere Milchsäure)³. Die freien organischen Säuren werden dabei ohne Bildung von CO_2 assimiliert (vgl. S. 253). Die Oxalsäurebildung aus Zuckerarten soll hier über Gluconsäure und 2-Ketogluconsäure führen, doch liegen hierfür noch keine Beweise vor. Weiterhin soll die Oxalsäure in einem reversiblen Gleichgewicht mit Reservekohlehydraten stehen³:



Die Vorstellung über die Oxalsäurebildung aus Oxalessigsäure⁴ ließ sich nicht stützen, denn aus dieser konnte niemals Oxalsäure erhalten werden³.

2. Oxalsäurebildung in physiologisch alkalischer Lösung findet aus sehr zahlreichen C-Verbindungen statt; außer den Zuckerarten kommen dabei Zuckeralkohole, Glycerin, Alkohol, sowie besonders die Alkalisalze der C_2 -, C_4 - und C_6 -Säuren in Frage, nämlich Essigsäure, Glycolsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Aconitsäure, Tricarballoxyäure, Citronensäure, Gluconsäure, Glucuronsäure, Zuckersäure. Dagegen wird aus den freien Säuren in der Regel keine Oxalsäure gebildet (vgl. oben). Die Menge der frei werdenden Base soll die Menge der entstehenden Oxalsäure bestimmen⁵. — Über die

¹ FRAYON: Bioch. J. **14**, 548 (1921).

² CHRZĄSZCZ und ZAKOMORNY: Biochem. Z. **259**, 156 (1933).

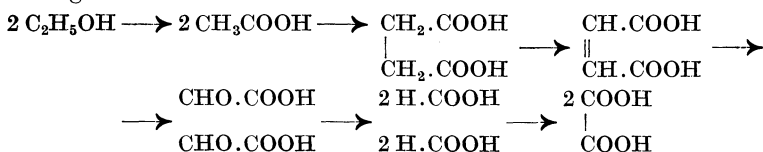
³ ALLSOPP: New Phytologist **36**, 327 (1937).

⁴ RAISTRICK und CLARK: Bioch. J. **13**, 329 (1919).

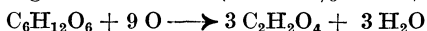
⁵ WEHMER: Bct. Ztg. **49**, 233 (1891).

Bildung von Oxalsäure wurde angesichts der so verschieden in Betracht kommenden C-Quellen verschiedene Vorstellungen entwickelt. Von besonderem Interesse sind jene Anschauungen, bei denen aus dem Zuckerabbau stammende Substanzen als Zwischenprodukte der Oxalsäurebildung in Frage kommen, wobei vor allem Essigsäure und die aus dieser entstehenden Säuren von Wichtigkeit sind.

Bei der Einwirkung von *A. niger* auf Ca-Acetat konnten Glycolsäure sowie Glyoxylsäure in Form von Derivaten isoliert werden¹. Das Vermögen zur Durchführung dieser Oxydation kommt zahlreichen Pilzen zu². In hohen Ausbeuten wurde Oxalsäure aus Na-Acetat und Na-Succinat erhalten³. Von besonderem Interesse ist sodann die Bildung von Ameisensäure und Glyoxylsäure bei der Einwirkung von *Aspergillus*- und *Penicillium*arten auf Ca-Fumarat⁴. Es wurde daher die Vorstellung entwickelt⁴, daß die weitere Bildung von Oxalsäure über Ameisensäure führen könnte, gemäß der Formulierung:



Es konnte dann auch bei der Einwirkung von Pilzdecken auf Ca- oder Na-Formiat oder bei der Kultivierung der Pilze auf dem ersteren Oxalsäure erhalten werden⁵, doch wurde dabei die Möglichkeit, daß dieselbe aus Mycelsubstanzen entstanden sei, nicht ausgeschlossen⁶, so daß dieser Weg der Oxalsäurebildung noch nicht bewiesen erscheint. — Andererseits ließ sich aber auch kein Beweis für die Oxalsäurebildung über Oxalessigsäure erbringen (vgl. oben), indem das Na-Salz derselben durch die Pilze unter Bildung von Brenztraubensäure decarboxyliert wurde. — Auf Grund von Ausbeutebestimmungen bei der Oxalsäurebildung aus Zucker in Gegenwart von Phosphatpuffer (vom pH 9,5) wurde wahrscheinlich gemacht, daß aus 1 Mol. Hexose 3 Mol. Oxalsäure gebildet werden⁷ (also 150% d. Th.):



Falls das Zuckermolekül durch Pilze unter Spaltung in C₃-Ketten abgebaut werden sollte, müßte daher auch hier mit einer Resynthese von Kohlehydraten gerechnet werden (vgl. dazu S. 253).

¹ CHALLENGER, SUBRAMANIAM und WALKER: Soc. 1927, 200.

² BERNHAUER und SCHEUER: Biochem. Z. 253, 11 (1932).

³ BUTKEWITSCH und FEDOROFF: Biochem. Z. 219, 87 (1930).

BERNHAUER und SIEBENÄUGER: Bio. Z. 240, 232 (1931). — BERNHAUER und SLANINA: Biochem. Z. 274, 97 (1934).

⁴ CHRZĄSZCZ und ZAKOMORNY: Biochem. Z. 259, 156 (1933).

⁵ CHRZĄSZCZ und ZAKOMORNY: Biochem. Z. 263, 105 (1933); 279, 64 (1935). — BERNHAUER und SLANINA: Biochem. Z. 264, 109 (1933); 274, 97 (1934).

⁶ BUTKEWITSCH: 272, 371 (1934). — BUTKEWITSCH, MENZSCHINSKAJA und TROFIMOVA: Biochem. Z. 276, 446 (1935). — BUTKEWITSCH und OSNICKAJA: C. r. Ak. Sc. USSR. 10, 361 (1936).

⁷ TSCHESNOKOFF: Mikrobiol. (USSR.) 1, 390 (1932).

56. Übung:

Alkoholische Gärung der Schimmelpilze.

a) Die alkoholische Gärung durch *Rhizopus nigricans*. Die Pilze werden in einigen Kolben in analoger Weise wie in Übung 52a zur Entwicklung gebracht; dann wird die eine Hälfte der Versuche unter normalen Verhältnissen weiter belassen, die andere Hälfte mit einem Gärverschuß versehen. Nach etwa 4 Tagen werden Kolben von jeder Serie abgebrochen und analysiert, ebenso in weiteren Intervallen von 4—5 Tagen. Es wird jeweils das Mycelgewicht ermittelt, ferner der Zuckerverbrauch, die Acidität der Lösung usw.; die Bestimmung des Alkohols erfolgt im Destillat eines aliquoten Teiles in der gleichen Weise wie in Übung 7d. Es zeigt sich bei dem Versuch, daß auch unter normalen (aeroben) Bedingungen Alkohol in beträchtlichen Mengen in der Nährlösung (gegen 2%) angehäuft wird und unter anaeroben Bedingungen etwa doppelt so viel. Säuren treten unter anaeroben Bedingungen nur in geringen Mengen auf.

Hinsichtlich einer besonderen Methodik und Apparatur zur Bestimmung des Gärvermögens der Schimmelpilze unter anaeroben Bedingungen mittels fertiger Pilzdecken vgl. TAMIYA und MIWA¹. Besonders empfehlenswert scheint jedoch auch für derartige Versuche die Verwendung von submerser Mycel (Schüttelmycel) zu sein (vgl. S. 240).

b) Die Sulfitgärung des *Aspergillus niger*². In einigen ERLENMEYER-Kolben von 300 ccm Inhalt werden auf je 100 ccm Nährlösung (5% Zucker, 0,1% NH_4NO_3 , 0,05% KH_2PO_4 und 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) die Pilze bei 30° zur Entwicklung gebracht (*Aspergillus niger*, vorteilhafter Weise einige verschiedene Pilzstämmen); nach etwa 4 Tagen werden pro Kolben je 2 g Na_2SO_3 zugesetzt; am 2., 4. und 6. Tag nach dem Zusatz werden die Versuche abgebrochen und aufgearbeitet, Filtration, Bestimmung des Pilzdeckengewichtes, Auffüllen des Filtrates, Entnahme von Proben für die Zuckerbestimmung und Acetaldehydbestimmung wie in Übung 8b. (Die Ausbeute an Acetaldehyd beträgt bei Anwendung geeigneter Pilze 5—10% d. Th., bezogen auf verbrauchten Zucker. Bei Berechnung der Acetaldehydmenge unter Bezugnahme auf den Zuckerverbrauch in den zweitägigen Intervallen sind die Ausbeutezahlen wesentlich höher.)

Unter grundsätzlich analogen Bedingungen konnte auch die Bildung von Brenztraubensäure und Dimethylbrenztraubensäure beobachtet werden³. (Isolierung derselben im Wasserdampfdestillat mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin.)

¹ TAMIYA und MIWA: Z. Bot. 21, 417 (1929).

² Vgl. BERNHAUER und THELEN: Biochem. Z. 253, 30 (1932).

³ HIDA: J. Shanghai Sci. Inst. 4 (1), 201 (1935).

c) **Gewinnung von Methylglyoxal¹.** In vier ERLÉNMEYER-Kolben von 300 ccm Inhalt werden die Pilze auf einer Lösung von 5% Glucose mit den erforderlichen Nährsalzen (wie zuvor) zur Entwicklung gebracht, nach 2 Tagen bei 30° wird die Kulturflüssigkeit entfernt, das Mycel gründlich ausgewaschen und die Pilzdecken zweimal je 3 Stunden bei 30° hungern gelassen. Dann werden je 100 ccm einer 0,25%igen Lösung von Natriumbexose-diphosphat und 1% Toluol zugesetzt. Nach 24 Stunden bei 30° werden die Lösungen filtriert, vereinigt und mit etwa 100 ccm einer 1,6%igen Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n-Salzsäure versetzt. Im übrigen wird wie in Übung 12 b (S. 135) weiter vorgegangen.

Anhang: Beziehungen zwischen der alkoholischen Gärung und den Säurebildungsprozessen bei den Schimmelpilzen.

Eine Reihe von Befunden spricht dafür, daß bei manchen oxydativen Säuregärungen der Schimmelpilze zunächst eine alkoholische Zuckerspaltung stattfindet und daß dann erst die typischen Prozesse einsetzen, die für die oxydativen Säuregärungen charakteristisch sind. Im folgenden sollen die Beziehungen zwischen der alkoholischen Gärung und den Säurebildungsprozessen bei den einzelnen Gruppen von Pilzen noch kurz zusammengefaßt werden.

1. Fusarien-Gärungen. Die alkoholische Gärung ist bei dieser Pilzgruppe sehr stark ausgeprägt. Das Gärvermögen mancher Fusarien ist von der gleichen Größenordnung wie das der Hefen². Dieselben vermögen aber nicht nur die Zymohexosen, sondern auch Pentosen sowie Rhamnose zu vergären. Weiterhin tritt vielfach Acetaldehyd in den Pilzkulturen auf³, ferner wurden auch Essigsäure und Bernsteinsäure⁴ und schließlich auch Äpfelsäure und Citronensäure nachgewiesen⁵. Diese Säuren wurden auch bei der Einwirkung der Pilze auf Alkohol oder Essigsäure beobachtet^{5, 6}.

2. Mucoraceen-Gärungen. Wohl alle Mucoraceen sind zur alkoholischen Gärung unter aeroben Bedingungen in mehr oder weniger hohem Maße befähigt. Manche Arten besitzen sogar ein recht erhebliches Gärvermögen. Der Alkohol häuft sich in der Flüssigkeit zu etwa 2–4% an, unter anaeroben Bedingungen in der Regel noch

¹ Vgl. SUTHERS und WALKER: *Biochemie. J.* **26**, 317 (1932).

² Vgl. ANDERSON: *Res. Pub. Univ. Minn. Biol. Sci.* **5**, 237 (1924). — NORD: *Protoplasma* **2**, 303 (1927). — WHITE und WILLAMAN: *Bioch. J.* **22**, 583 (1928). — MAHDIHASSAN: *Biochem. Z.* **226**, 203 (1930). — RAISTRICK und Mitarbeiter: *Phil. Trans. B* **220**, Teil V (1931). — ANDERSON, EVERETT und ADAMS: *J. Agr. Res.* **46**, 473 (1933).

³ LECHTER und WILLAMAN: *Phytopath.* **16**, 941 (1926).

⁴ ANDERSON, EVERETT und ADAMS, l. c. — YABUTA, KATSUJI und HAYASHI: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **10**, 1059 (1934). — LOCKWOOD, STUBBS und SENSEMAN: *C. Bact.* **II** **98**, 167 (1938).

⁵ DAMMANN, ROTINI und NORD: *Biochem. Z.* **297**, 184 (1938).

⁶ ROTINI, DAMMANN und NORD: *Biochem. Z.* **288**, 414 (1936).

mehr. Als weitere Produkte der alkoholischen Gärung finden sich vielfach auch Glycerin und Acetaldehyd vor. Beide Stoffe lassen sich in Gegenwart von Sulfit (2. Vergärungsform, vgl. S. 118) in reichlichen Mengen anhäufen (so besonders bei *M. javanicus*¹). Während nun in saurer Lösung der Alkohol nur langsam wieder abgebaut wird, verschwindet derselbe in Gegenwart von Calciumcarbonat recht rasch unter Bildung von Säuren (vgl. S. 258). Die Fumarsäuregärung scheint gemäß den bisherigen Befunden stets eine alkoholische Gärung zur Voraussetzung zu haben (vgl. S. 260) und auch Essigsäure läßt sich meist — wenn auch nur in geringer Menge — in den Pilzkulturen nachweisen.

3. Aspergillaceen-Gärungen. Die *Aspergillaceen* besitzen das Vermögen zur alkoholischen Gärung in recht verschiedenem Ausmaße. So vermag die *Allescheria Gayoni* bei beschränkter Luftzufuhr bis 8% Alkohol anzuhäufen und unter aeroben Bedingungen auch sehr hohe Konzentrationen von Alkohol anzugreifen (bis 10%). Ferner soll *Asp. clavatus* unter anaeroben Bedingungen in seinem Gärvermögen der Hefe kaum nachstehen². Auch andere Pilze wie *Asp. oryzae* oder *Asp. niger* zeigen unter anaeroben Bedingungen ein recht erhebliches Gärungsvermögen; insbesondere jüngere Mycelien sind fast immer gärfähiger und zymasereicher als alte. Sonstige Daten, die für die alkoholische Gärung der *Aspergillaceen* sprechen: Abfangung von Acetaldehyd³, Auffindung von Glycerin als Stoffwechselprodukt⁴, Gewinnung von Methylglyoxal aus Hexosediphosphat⁵. Während sich also unter anaeroben Bedingungen die alkoholische Gärung der Schimmelpilze recht gut bewerkstelligen läßt, kommt es unter aeroben Bedingungen selten zur Anhäufung des Alkohols, sondern es setzt rasch Säurebildung ein.

Ob bestimmte Beziehungen zwischen der alkoholischen Gärung der *Aspergillaceen* und den Säurebildungsprozessen besteht, läßt sich noch nicht mit Sicherheit entscheiden (vgl. dazu S. 252).

Zur Charakteristik der Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Pilzgruppen bei der alkoholischen Gärung möge folgendes dienen: Bei den *Fusarien* überwiegt wie bei den Hefen auch unter aeroben Bedingungen die alkoholische Gärung; oxydative Säurebildung findet nur in sehr geringem Ausmaße statt. Bei den *Mucoraceen* findet unter aeroben Bedingungen auch stets alkoholische Gärung statt, doch verlaufen die im Anschluß daran stattfindenden oxydativen Säurebildungsprozesse vielfach recht intensiv. Die *Aspergillaceen* bilden dagegen unter aeroben Bedingungen in der Regel überhaupt keinen Alkohol, die Säurebildung überwiegt zumeist sofort über alle anderen Prozesse. Sie besitzen jedoch gleichfalls ein komplettes Zymasensystem, das aber nur unter anaeroben Bedingungen zur Wirkung kommt.

4. Anhang: Oxydative Wirkungen der Hefen. In Gegenwart von Sauerstoff und ausreichender Nährsalzmengen wird der Zucker fast völlig zum Aufbau neuer Hefezellen verwendet (vgl. S. 98 ff.) Dabei wird jedoch der Zucker nicht als solcher assimiliert, sondern wohl auf dem Weg über Alkohol weiter verwertet. Auch verschiedene

¹ NEUBERG und COHEN: *Biochem. Z.* **122**, 204 (1921).

² TAMIYA und MIWA: *Z. Bot.* **21**, 417 (1929).

³ Vgl. BERNHAUER und THELEN: *Biochem. Z.* **253**, 30 (1932).

⁴ Bei *Asp. niger*: MOLLIARD, 1922; bei *Asp. Wentii*: RAISTRICK und Mitarbeiter, 1931.

⁵ SUTHERS und WALKER: *Biochemic. J.* **26**, 317 (1932).

andere Stoffe können in Gegenwart von O_2 und Nährsalzen assimiliert und in Leibessubstanz übergeführt werden (vgl. S. 99). In Gegenwart nicht ausreichender Nährsalzmengen und gleichzeitiger starker Belüftung wird dagegen ein Teil des Zuckers bis zu CO_2 veratmet. Auch im pH-Bereich 8–11 existiert nur noch Atmung ohne gleichzeitige Gärung¹.

Von besonderem Interesse sind sodann die Dehydrierungen, die unter der Einwirkung von Hefe auf Alkohol vor sich gehen. So wird Alkohol durch verarmte Hefe hauptsächlich zu CO_2 veratmet, doch konnten als Zwischenprodukte auch Essigsäure (zu 30–40%) und Bernsteinsäure (zu etwa 13% bezogen auf umgesetzten Alkohol) nachgewiesen werden². Auch kleine Mengen Fumarsäure wurden dabei isoliert. Bei der Einwirkung der verarmten Hefe auf Ba-Acetat konnten neben Bernsteinsäure auch etwa 10% Citronensäure (bezogen auf umgesetzte Essigsäure) gewonnen werden³. Neuerdings gelang es die Ausbeute an Citronensäure auf 20% zu steigern⁴. Analoge Versuche mit Trideutero-Essigsäure ergaben gleichfalls Bernsteinsäure und Citronensäure⁵; dabei wies der Gehalt der Reaktionsprodukte an Deuterium darauf hin, daß eine direkte Umwandlung der Trideutero-Essigsäure in Bernsteinsäure und Citronensäure stattgefunden haben muß. Daraus geht zugleich hervor, daß die Reaktionsprodukte nicht aus Reservestoffen der Hefe entstanden sein können. Aber auch die Annahme, daß die Reaktionsprodukte aus den Ausgangsmaterialien auf dem Weg über Kohlehydrate gebildet worden sein könnten, erwies sich als unwahrscheinlich, da diese nur einen sehr geringen Gehalt an Deuterium aufwiesen. Die Vorstellung über die direkte Dehydrierung der Essigsäure unter Bildung von Bernsteinsäure und Citronensäure erscheint daher in diesem Fall gut gestützt (vgl. auch S. 252 und 260).

Von Interesse sind auch die oxydativen Wirkungen gewisser Spezialhefen und wilder Hefen. Hierher gehört das Vermögen einiger solcher, in Gegenwart von $CaCO_3$ reichliche Mengen von brenztraubensaurem Ca anzuhäufen⁶. Die Brenztraubensäure entsteht dabei durch Oxydation von Milchsäure. Kulturhefen erwiesen sich zu dieser Reaktion nicht befähigt⁷, wohl aber Oidien und manche Schimmelpilze⁸.

Schließlich sei noch erwähnt, daß Nektarhefen auch zur Bildung von Gluconsäure und Zuckersäure befähigt sind⁹, und daß auch Bildung von Oxalsäure durch Hefen nachgewiesen werden konnte, so durch Sacch. Hansen, eine Hefeart, die durch ihr Unvermögen zur alkoholischen Gärung charakterisiert ist¹⁰ sowie durch Torulaarten¹¹.

¹ TRAUTMANN und WASSERMANN: *Biochem. Z.* **236**, 35 (1931).

² WIELAND und CLAREN: *A.* **492**, 203 (1932). — WIELAND und WILLE: *A.* **503**, 70 (1933).

³ WIELAND und SONDERHOFF: *A.* **499**, 213 (1932).

⁴ SONDERHOFF und DEFFNER: *A.* **536**, 36 (1938).

⁵ SONDERHOFF und THOMAS: *A.* **530**, 195 (1937).

⁶ FERNBACH und SCHOEN: *C. r.* **157**, 1478 (1913); **158**, 1719 (1914); **170**, 764 (1920).

⁷ KERB: *B.* **52**, 1795 (1919). — KERB und ZECKENDORF: *Biochem. Z.* **122**, 307 (1921).

⁸ MAZÉ und RONT: *C. r. Soc. Biol.* **78**, 706 (1916); **79**, 336 (1917).

⁹ GRÜSS: *Jb. wiss. Bot.* **66**, 155, 171, 177 (1926); *Wschr. f. Brauerei* **44**, 233 (1927).

¹⁰ ZOFF: *Ber. bot. Ges.* **7**, 94 (1889).

¹¹ PERWOZWONSKY: *C. Bact.* **II** **81**, 372 (1930).

Anhang I.

**Allgemeine Einrichtungen und Anordnungen
im gärungsschemischen Laboratorium.**

(Organisatorisches zum Laboratoriumsbetrieb.)

1. Allgemeine Einrichtungen zum Mikroskopieren.

Die notwendigen Einrichtungsgegenstände werden am besten in einem gesonderten Raum untergebracht, in dem eine Anzahl von Plätzen für die Durchführung der mikroskopischen Arbeiten vorhanden sind. Ferner wird dieser Raum auch als Impfraum benutzt.

a) Geräte zum Mikroskopieren: Einige Mikroskope mit einfachem Stativ, mit Kondensor, Irisblende und Objektivrevolver, zwei bis drei Objektive und zwei bis drei Okulare, Einrichtung für Immersion; Vergrößerung etwa 50, 100, 200, 400, 600, für sehr kleine Bakterien (z. B. manche Essigbakterien) bis 1200. Ein Mikroskop mit größerem Stativ für besondere Zwecke (Mikrophotographie u. a.), Vergrößerung bis 1500. Ein Binokularmikroskop zur Untersuchung von Plattenkulturen.

Sonstige Hilfsmittel: Okularmikrometer, Objektmikrometer, Zeichenapparat, Einrichtung zum Mikrophotographieren, SKAR-scher Apparat oder STEINER-THOMA-Kammer für Zählungen, Glasgeräte wie Objektträger (auch mit Hohlschliff), Deckgläschen usw.

b) Reagentien und Farbstofflösungen sind geordnet in einem eigenen Kasten oder auf einem Regal aufzubewahren. Man benutzt Stammlösungen, die von Zeit zu Zeit zu erneuern sind. Die wichtigsten Farbstoffe, von denen man Stammlösungen anfertigt, sind etwa: Methylenblau, Methylviolett, Fuchsin, Bismarckbraun, Methylgrün, Gentianaviolett, Nigrosin, Naphtoresorcin, Lackmusblau; ferner hält man bereit: Lugolsche Lösung, Tusche, Xylol, Alkohol usw.

c) Sonstige Hilfsmittel: Glasstäbe, Pinzetten, CORNETSche Pinzette, Skalpelle, Canadabalsam, Asphaltlack, Vaseline-Paraffinöl, Präpariernadeln, Glasschälchen, Glasdosen, passende Brenner usw.

2. Anordnungen für die Kultivierung der Organismen.

a) Einrichtungen zur Züchtung der Gärungsorganismen. Die *Vorbereitung der Nährböden* wird in der sogenannten „Nährbodenküche“ (vgl. unten) vorgenommen, in der auch die Vorbereitung der Gärversuche erfolgt.

Die *Impfung der Nährböden mit den Organismen*, also die Anlegung der Kulturen, nimmt man am besten im Mikroskopierraum

an besonderen, möglichst zugfreien Arbeitsplätzen vor. Oberhalb derselben bringt man vorteilhafterweise zum Schutz gegen herabfallende Keime eine Glasplatte an. Die erforderlichen Geräte, z. B. Impfnadeln, Pinzetten, Skalpelle, Pipetten, bringt man in besonderen Holzblöcken unter, so daß sie stets verwendungsbereit sind. — Impfschränke, Einrichtungen für Reinzüchtungen (Federstrichkultur usw.) u. a. werden gleichfalls in der Nähe bereitgestellt.

b) Aufbewahrung der Nährböden und Substrate für die Züchtung der Gärungsorganismen. Dieselben werden in dem gleichem Raum wie die Kulturen selbst aufbewahrt (vgl. unten), also bei tiefer Temperatur¹; manche Nährböden werden zweckmäßigerweise (um Austrocknen zu verhindern, z. B. Agarröhrchen) in Eisschränken aufbewahrt. Die wichtigsten Substrate sollen stets in gebrauchsfertigem Zustand, bezeichnet mit allen erforderlichen Angaben (vgl. S. 32) vorhanden sein.

c) Einrichtungen für die Aufbewahrung der Gärungsorganismen. Proberöhren mit Organismen (z. B. Agarkulturen) werden am besten in Holzblöcken mit fünf bis sechs Löchern zur Aufnahme der Röhren aufgestellt. Ebenso verwendet man solche für die Aufbewahrung kleinerer Glaskölbchen (z. B. für FREUDENREICH-Kölbchen) mit den Gärungserregern. Die Holzblöcke mit den Kulturen bewahrt man in besonderen Schränken auf, die mit Löchern zum Luftaustausch versehen sind. Dieselben werden in einem eigenen Raum, der vom sonstigen Betrieb streng getrennt ist, aufbewahrt. Dort soll relativ niedrige und möglichst konstante Temperatur herrschen (am geeignetsten ein trockener Kellerraum). Bei manchen Organismen ist zur Erhaltung des Gärvermögens die Aufbewahrung bei noch tieferer Temperatur (etwa 4—6°) erforderlich (z. B. in Kühlschränken, die in dem gleichen Raum aufgestellt werden, in dem sich die Kulturen befinden).

3. Allgemeine Einrichtungen für die Durchführung von Gärversuchen.

a) Vorbereitung der Gärversuche. Es dient dazu am besten ein eigener Raum, der zugleich zur Herstellung der Nährböden für die Kultivierung der Organismen dient („Nährbodenküche“). Einrichtungsgegenstände: Wasserbäder, Tarawaagen und größere Waagen, Schränke mit den einfachen gebräuchlichsten Gärgeräten und Kulturgefäßen usw.² Ferner bewahrt man hier die

¹ Ebenso können hier die für die Durchführung der Gärversuche erforderlichen Materialien verwahrt werden.

² Apparaturen und Gärgeräte für besondere Zwecke werden zweckmäßigerweise in einem eigenen Magazin aufbewahrt.

Stammlösungen der wichtigsten Nährsalze auf, und zwar in etwa 10—100fach konzentriertem Zustand, also z. B. wenn die Lösung 0,05% $MgSO_4$ enthalten soll, so bereitet man eine 5%ige Stammlösung vor und nimmt von dieser 1 ccm für 100 ccm Nährlösung. Lösungen organischer Substanzen (Pepton, Hefesaft usw.) werden zweckmäßigerweise frisch bereitet; für kurze Zeit können dieselben nach dem Sterilisieren im Kulturraum bzw. Kühlschrank aufbewahrt werden, ähnlich wie die fertigen Nährböden selbst. Ferner können sich im Vorbereitungsraum die Abzüge mit den Sterilisationsapparaten befinden (vgl. unter b). Für die Vorbereitung von Reihenversuchen braucht man hier geräumige Arbeitstische, auf denen die Gefäße aufgestellt und mit den Nährlösungen beschriftet werden können.

Bei der *Vorbereitung der Reihenversuche* selbst geht man etwa folgendermaßen vor, wie an einem Beispiel erläutert sei: 20 ERLÉNMEYER-Kolben sollen mit je 100 ccm einer Nährlösung von bestimmter Zusammensetzung beschriftet werden; und zwar z. B. 10% Rohrzucker, 0,2% NH_4NO_3 , 0,1% KH_2PO_4 und 0,025% $MgSO_4$. Man löst zu diesem Zweck zunächst 220 g Rohrzucker in etwa 1 l Wasser in der Wärme auf, dann fügt man von den Stammlösungen (20%ige NH_4NO_3 -Lösung, 10%ige KH_2PO_4 -Lösung und 2,5%ige $MgSO_4$ -Lösung) je 22 ccm hinzu und füllt das Ganze nach dem Erkalten auf 2200 ccm auf. Nach gutem Umschütteln füllt man die Lösung in einen Abfüllapparat (vgl. Abb. 38), mit dessen Hilfe je 100 ccm in die einzelnen ERLÉNMEYER-Kolben verteilt werden. Handhabung des Apparates: Man läßt mittels des Zweiweghahnes die Flüssigkeit aus der Flasche in die Bürette einfließen (unter eventuellem schwachem Ansaugen bei a) und stellt auf die oberste Marke ein. Durch Drehen des Zweiweghahnes läßt man dann das gewünschte Flüssigkeitsvolumen in die Kolben einfließen, ohne den Kolbenhals zu benetzen. (Der verbleibende Rest der Lösung kann für die Bestimmung des pH-Wertes, für die Kontrolle des Zuckergehaltes u. a. verwendet werden.)

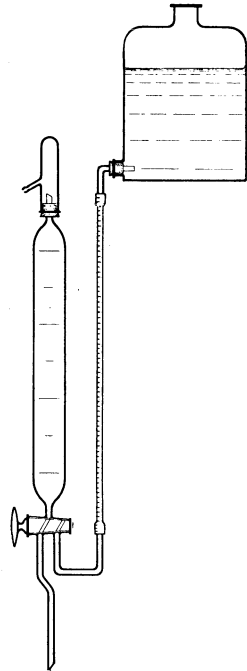


Abb. 38. Abfüllapparat für Nährlösungen.

b) Einrichtungen zum Sterilisieren. Für Proberöhren und kleine Kulturgefäße benutzt man am besten einen kleinen Dampftopf für große Gärgefäße sowie Reihenversuche entsprechend große Sterilisatoren, zur Keimtötung unter Druck Autoklaven. Man stellt diese Apparaturen zweckmäßigerweise in

einem Abzug auf, der sich in der „Nährbodenküche“ befindet (vgl. oben), oder man benutzt eigene, mit Ventilatoren sowie Öl-anstrich versehene Sterilisationskammern, die an die „Nährbodenküche“ angrenzen.

Hinsichtlich der *Handhabung der Sterilisatoren* sei noch bemerkt, daß von denselben nach dem Sterilisieren der Deckel sofort abgenommen werden muß, und die Gefäße gleich entnommen werden sollen, um ein Feuchtwerden der Wattestöpsel zu verhindern. Beim Sterilisieren im Autoklaven geht man so vor, daß man nach dem Beschicken, Schließen und Anheizen desselben zunächst durch den Lüftungshahn die Luft ausströmen läßt; erst sobald Dampfentwicklung einsetzt, wird der Entlüftungshahn geschlossen. Empfehlenswert ist die Benutzung von Apparaten mit einer automatischen Regulier-vorrichtung zum Heizen. Der Autoklav soll nach dem Sterilisieren erst dann geöffnet werden, sobald der Druck auf etwa 0,1–0,2 Atm. gefallen ist. Die Wattestöpsel der Gefäße müssen mittels einer Kappe aus Pergamentpapier gegen Feuchtigkeit geschützt werden. Ein längeres Verweilen der Kolben, Proberöhren usw. im Autoklav ist zu vermeiden.

c) Kulturschränke und Gärkammern. Für kleinere Versuche sowie für die Entwicklung der Impfkulturen usw. benutzt man die üblichen *Brutschränke*, die entweder mit einem Wassermantel oder einem anderen Wärmeschutz umgeben sind und einen Thermo-regulator besitzen. Für besondere Zwecke verwendet man die *Wasserthermostaten*, die mit genauen Regulier-vorrichtungen zur Konstanthaltung der Temperatur versehen sind. Brutschränke und Thermostaten werden zweckmäßigerweise in einem eigenen „Thermostatenraum“ untergebracht.

Zur Durchführung größerer Gärversuche (besonders in präparativem Ausmaß) sowie für große Reihenversuche dienen *Gärkammern*, die auf einer bestimmten Temperatur gehalten werden (entweder durch Gas, elektrisch oder durch Dampf). Dieselben werden zweckmäßigerweise mit einem Ölanstrich versehen oder mit Kacheln ausgelegt, ferner mit einem Ventilator, Leitungen (gekennzeichnet durch entsprechenden Anstrich) für verschiedene Gase (Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Kohlen-dioxyd, Druckluft); ferner befinden sich hier verstellbare Regale für die Aufstellung der Gärgefäße, sowie größere Arbeitsplätze für besondere Gärapparaturen. Für die Durchführung größerer Gärversuche unter Rühren (z. B. Milchsäuregärung, Propion-säuregärung, präparative Versuche mit Hefe usw.) installiert man eine durch einen Elektromotor betriebene Transmission, an die die einzelnen Rührversuche angeschlossen werden können. Ferner kann man in den Gärkammern bequem Schüttelvorrichtungen unterbringen, wie sie für die Durchführung mancher Gärversuche

benötigt werden (z. B. Versuche mit Massenkulturen von Bakterien, Hefen usw., für das Arbeiten mit „Schüttelmycel“ von Schimmelpilzen u. a.).

Für Versuche in halbtechnischem Ausmaß benutzt man besondere Gärkammern, die für die jeweiligen speziellen Zwecke eingerichtet werden.

4. Einrichtungen zur Aufarbeitung der Gärversuche¹.

Die allgemeinen Destillations- und Extraktionsanlagen sowie die Apparaturen für besondere analytische Zwecke usw. können zumeist in einem großen Arbeitsraum untergebracht werden und bleiben hier während der Durchführung der gärungschemischen Arbeiten dauernd aufgestellt.

a) **Destillierapparate für analytische Zwecke**, z. B. für die „Halbdestillation“, Mikrodestillation, für allgemeine analytische Trennungen, Apparate für die Bestimmung von Milchsäure, Acetaldehyd usw. (vgl. S. 119, 174, 189, 190 u. a.).

b) **Destillationsapparate für präparative Aufarbeitungen**: Dampfdestillation, große Kolonnenapparate, Destillierapparaturen für die fraktionierte Destillation der Gärprodukte, Vakuumdestillationen; Vakuumverdampfungsanlagen bzw. Verdunstungskasten (FAUST-HEIM-Apparat) für die Gewinnung nicht flüchtiger Gärprodukte usw.

c) **Extraktionsapparate** zur Gewinnung von Gärprodukten aus den Gärmaischen (Flüssigkeitsextraktoren) oder aus festen Eindampfrückständen (Apparate nach dem SOXHLET-Prinzip) usw.

d) **Zentrifugen** zur Klärung von Flüssigkeiten, zum Abschleudern von Bakterienmassen, von Hefe usw. bringt man am besten in eigenen Räumen unter.

e) **Einrichtungen zur Titration** sind an einem besonderen Arbeitsplatz des allgemeinen Aufarbeitungsraumes unterzubringen oder in einem besonderen kleineren analytischen Raum. Man verwendet zweckmäßigerweise automatische Büretten. Die erforderlichen Maßflüssigkeiten sollen stets gebrauchsfertig vorhanden sein.

f) **Einrichtungen für sonstige analytische Zwecke** sind gleichfalls an bestimmten Arbeitsplätzen unterzubringen; z. B. Zuckerbestimmungen, Bestimmung verschiedener Säuren usw.

Bei allen Einrichtungen muß streng darauf geachtet werden, daß alle erforderlichen Hilfsmittel, Reagenzien usw. stets in

¹ Hinsichtlich der wichtigsten allgemeinen Methoden und Apparaturen sowie einiger organisatorischer Fragen vgl. auch BERNHAUER: Einführung in die organisch-chemische Laboratoriumstechnik. Berlin: Julius Springer 1934.

verwendungsfähigem Zustand gehalten werden, um eine rasche Abwicklung des Betriebes zu ermöglichen.

Überblick der für die gärungschemischen Arbeiten erforderlichen Räume und allgemeinen Anordnungen.

1. *Kühlraum*. Dieser dient für die Aufbewahrung der Kulturen und Nährböden sowie verschiedener Substrate für die Gärversuche; derselbe ist mit Kühlschränken zu versehen. Vgl. 2b und c.

2. *Mikroskopierraum*, der zugleich als *Impfraum* zu benutzen ist. Vgl. 1 sowie 2a.

3. *Vorbereitungsraum* für die Gärversuche; dieser dient zugleich als „Nährbodenküche“; samt der *Sterilisationskammer*. Vgl. 3a und b, sowie 2a.

4. *Gärkammern* sowie *Thermostatenraum*, für die Durchführung der Gärversuche. Vgl. 3c.

5. *Allgemeiner Aufarbeitungsraum*, eventuell mit anschließendem *analytischen Raum* (Titrierraum). Vgl. unter 4.

6. *Magazin* und Glaskammer, für die Aufbewahrung der erforderlichen speziellen Geräte sowie der Reagentien usw.

Anhang II.

Umrechnungstabellen und Leitlinien der Protokollführung.

1. Verschiedene Umrechnungstabellen.

a) **Zuckerkurven** für die Berechnung der Analysen nach der Methode von BERTRAND und LEHMANN-SCHOORL-MAQUENNE¹. In den Abb. 39 und 40 sind, abweichend von den üblichen Zuckertabellen, die Werte in Kurvenform wiedergegeben. Aus den ermittelten Titrationswerten lassen sich so mit Hilfe der Kurven direkt die Milligramm Zucker ablesen.

Bei der Zuckerbestimmung nach BERTRAND ist noch zu beachten, daß die Stammlösungen nicht älter als 2–3 Monate sein sollen, da sonst die Zuckerwerte zu hoch ausfallen². Saure Lösungen sind vor der Bestimmung stets abzuneutralisieren. In Gegenwart von viel Proteinen, Peptonen oder Aminosäuren fallen die Werte zu niedrig aus.

b) **Die Molekulargewichte und Äquivalentgewichte der wichtigsten Substrate und Gärprodukte** sind in Tab. XXIII wiedergegeben, da dieselben für gärungschemische Berechnungen sehr häufig gebraucht werden.

c) **Die Molekulargewichte der wichtigsten Nährsalze**, deren Zusammensetzung (Krystallwassergehalt) sowie Gehalt an bestimmten Elementen finden sich in Tab. XXIV.

¹ Hinsichtlich sonstiger Zuckertabellen vgl. H. PRINGSHEIM und LEIBOWITZ, in KLEIN, Hdb. der Pflanzenanalyse, II, 1, S. 781 ff. Wien: Julius Springer 1932.

² Vgl. JOSEPHSON: B. 56, 1758 (1923).

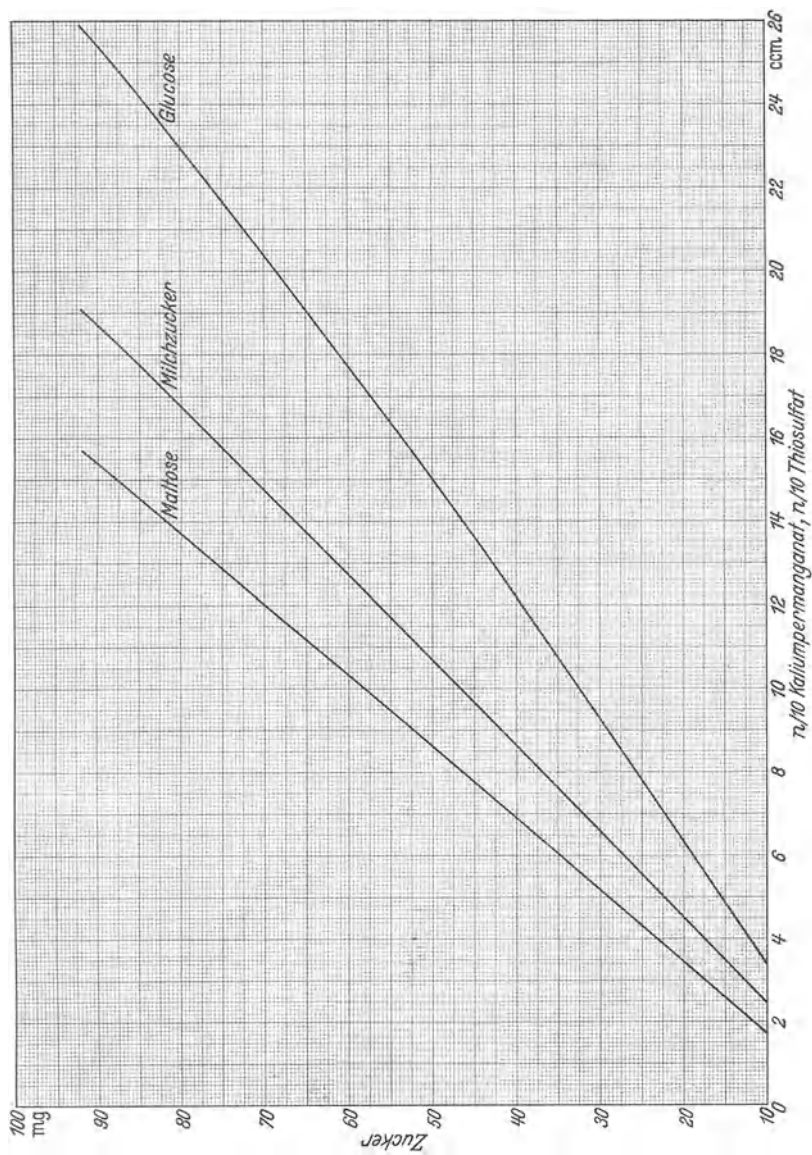


Abb. 39.

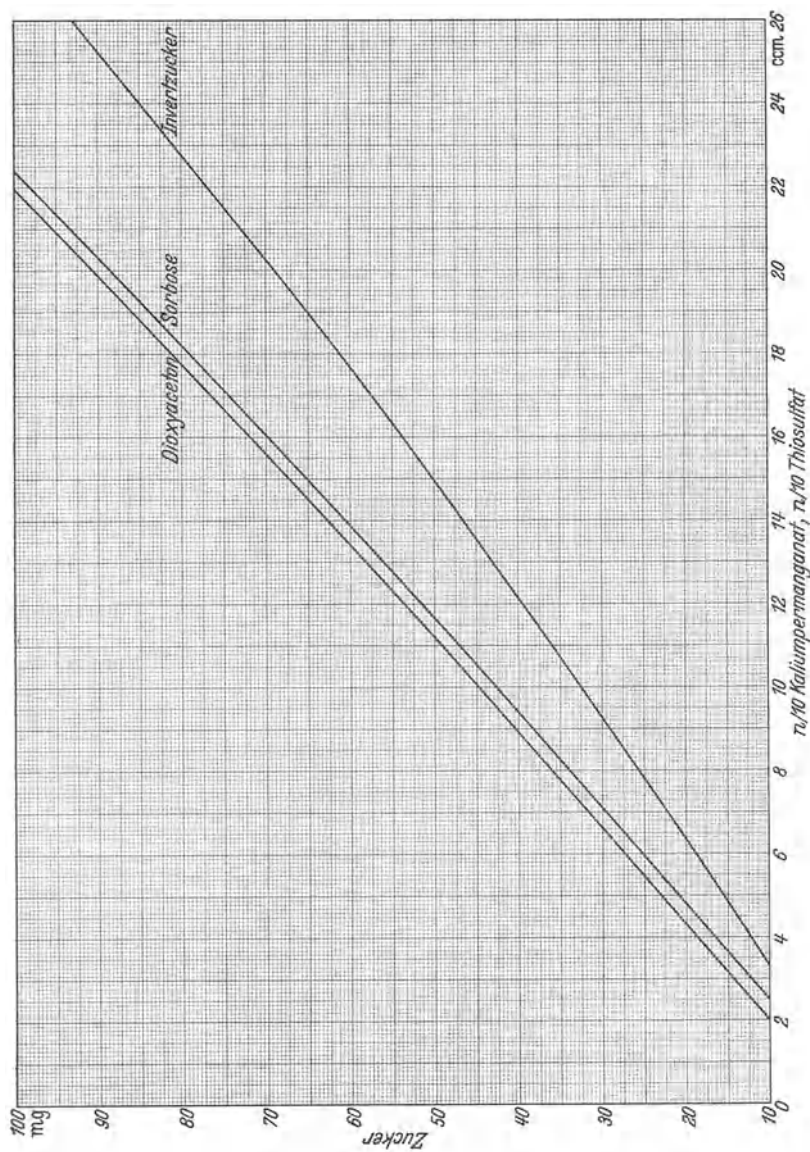


Abb. 40.

Tabelle XXIII.

Substrate und Gärprodukte	Formel ¹	Molekulargewicht	Hexoseäquivalent ²	Verhältnis zu Hexose in % ³
Acetaldehyd.	C ₂ H ₄ O	44	88	48,9
Acetaldol	C ₄ H ₈ O ₂	88	88	48,9
Acetessigsäure.	C ₄ H ₆ O ₃	102	102	56,7
Acetoin	C ₄ H ₈ O ₂	88	88	48,9
Aceton	C ₃ H ₆ O	58	58	32,2
Aconitsäure	C ₆ H ₆ O ₆	174	—	—
Aldehydgluconsäure .	C ₆ H ₁₀ O ₇	194	194	107,8
Äpfelsäure.	C ₄ H ₆ O ₅	134	(134)	(74,4)
Äthanol	C ₂ H ₆ O	46	92	51,1
Äthylenglycol	C ₂ H ₆ O ₂	62	—	—
Ameisensäure	CH ₂ O ₂	46	—	—
Arabinose.	C ₅ H ₁₀ O ₅	150	—	—
Arabit	C ₅ H ₁₂ O ₅	152	—	—
Arabonsäure	C ₅ H ₁₀ O ₆	166	—	—
Bernsteinsäure	C ₄ H ₆ O ₄	118	(118)	(65,5)
Brenztraubensäure. .	C ₃ H ₄ O ₃	88	88; 176	48,9; 97,8
Butanol.	C ₄ H ₁₀ O	74	74	41,1
Buttersäure	C ₄ H ₈ O ₂	88	88	48,9
2,3-Butylenglycol . .	C ₄ H ₁₀ O ₂	90	90	50,0
Butyraldehyd	C ₄ H ₈ O	72	72	40,0
Citronensäure	C ₆ H ₈ O ₇	192	(128; 192)	(71,1; 106,7)
Crotonaldehyd.	C ₄ H ₆ O	70	—	—
Crotonsäure	C ₄ H ₆ O ₂	86	—	—
Diacetyl	C ₄ H ₆ O ₂	86	86	47,8
Dioxyaceton	C ₃ H ₆ O ₃	90	180	100
Dulcit	C ₆ H ₁₄ O ₆	182	—	—
Erythrit	C ₄ H ₁₀ O ₄	122	—	—
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	60	120	66,7
Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180	180	100
Fumarsäure	C ₄ H ₄ O ₄	116	(116)	(64,4)

¹ Und zwar stets ohne Krystallwasser.

² Auf Grund der Gärungsgleichungen, soweit diese geklärt sind; falls diese noch nicht ganz gesichert sind, wurden die betreffenden Zahlen in Klammern gesetzt bzw. für beide Möglichkeiten des Reaktionsablaufes die Zahlen eingesetzt. Also z. B.: 180 g Glucose können theoretisch 58 g Aceton liefern.

³ Die Zahlen geben demnach die aus 100 Teilen Hexose erzielbaren Höchstausbeuten an.

Tabelle XXIII (Fortsetzung).

Substrate und Gärprodukte	Formel	Molekular- gewicht	Hexose- äqui- valent	Verhältnis zu Hexose in %
Galaktensäure	$C_6H_{12}O_7$	196	196	108,9
Galaktose	$C_6H_{12}O_6$	180	180	100
Gluconsäure	$C_6H_{12}O_7$	196	196	108,9
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180	180	100
Glycerin	$C_3H_8O_3$	92	92; 184	51,1; 102,2
Glycerinaldehyd	$C_3H_6O_3$	90	180	100
Glycerinsäure	$C_3H_6O_4$	116	116; 232	64,4; 128,8
Glycolsäure	$C_2H_4O_3$	76	—	—
Glyoxylsäure	$C_2H_2O_3$	74	—	—
Itaconsäure	$C_5H_8O_5$	148	—	—
Isopropanol	C_3H_8O	60	60	33,3
Ketogluconsäure	$C_6H_{10}O_7$	194	194	107,8
Kohlendioxid	CO_2	44	—	—
Kojisäure	$C_6H_6O_4$	142	142	78,9
Malonsäure	$C_3H_4O_4$	104	—	—
Maltose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342	171	95,0
Mannit	$C_6H_{14}O_6$	182	182	101,1
Mannonsäure	$C_6H_{12}O_7$	196	196	108,9
Mannose	$C_6H_{12}O_6$	180	180	100
Methan	CH_4	16	—	—
Methylglyoxal	$C_3H_4O_2$	72	144	80,0
Milchsäure	$C_3H_6O_3$	90	180	100
Oxalsäure	$C_2H_2O_4$	90	(100; 270)	(100; 150)
Oxalessigsäure	$C_4H_4O_5$	132	(132)	(73,3)
Propandiol	$C_3H_8O_2$	76	—	—
Propanol	C_3H_8O	60	120	66,7
Propionsäure	$C_3H_6O_2$	74	148	82,2
Propylaldehyd	C_3H_6O	58	116	64,4
Rohrzucker	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342	171	95,0
Sorbit	$C_6H_{11}O_6$	182	182	101,1
Sorbose	$C_6H_{12}O_6$	180	180	100
Tricarballoylsäure	$C_6H_8O_6$	172	—	—
Weinsäure	$C_4H_6O_6$	150	—	—
Xylose	$C_5H_{10}O_5$	150	—	—
Zuckersäure	$C_6H_{10}O_8$	210	210	116,7

Tabelle XXIV.

Name	Formel	Molekular- gewicht	Prozentgehalt an bestimmten Elementen ¹
Ammonium			
-carbonat	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	114,10	N 12,3
-chlorid	NH_4Cl	53,50	N 26,1
-nitrat	NH_4NO_3	80,05	N 35,0
-phosphat, prim.	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	115,10	N 12,2; P 26,96
-phosphat, sek.	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	132,13	N 21,2; P 23,5
-sulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132,15	N 21,2; S 24,24
Calcium			
-carbonat	CaCO_3	100,07	
-chlorid	CaCl_2	110,99	Ca 36,0
-chlorid-hydrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	219,05	Ca 18,2
-nitrat	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	236,13	N 5,9; Ca 16,9
Kalium			
-carbonat, prim.	KHCO_3	100,11	
-carbonat, sek.	K_2CO_3	138,20	
-carbonat, hydrat, sek.	$\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$	165,22	
-chlorid	KCl	74,56	K 52,2
-nitrat	KNO_3	101,11	N 13,86; K 38,67
-phosphat, prim.	KH_2PO_4	136,16	P 22,8; K 28,8
-phosphat, sek.	K_2HPO_4	174,25	P 17,8; K 44,9
-sulfat	K_2SO_4	174,27	S 18,3; K 44,9
Magnesium			
-carbonat	MgCO_3	84,32	
-chlorid	MgCl_2	95,24	Mg 25,5
-chlorid-hydrat	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	203,34	Mg 11,97
-nitrat	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	256,43	N 5,5; Mg 9,5
-sulfat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246,50	S 12,6; Mg 9,8
Natrium			
-carbonat, prim.	NaHCO_3	84,01	
-carbonat, sek.	Na_2CO_3	106,00	
-carbonat, hydrat, sek.	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	286,16	
-chlorid	NaCl	58,46	Na 39,65
-nitrat	NaNO_3	85,01	N 16,47; Na 27,0
-phosphat, prim.	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	156,06	P 19,9; Na 14,74
-phosphat, sek.	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	358,24	P 8,66; Na 12,84
-sulfat	Na_2SO_4	142,07	S 22,5; Na 32,4
-sulfat-hydrat	$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	322,23	S 10,0; Na 14,3
-sulfit	Na_2SO_3	126,07	
-sulfit-hydrat	$\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	252,18	

¹ Aus dem Prozentgehalt kann sofort die für einen Versuchsansatz erforderliche Menge eines Nährsalzes berechnet werden. Z. B. pro Versuch sollen 0,07% N vorhanden sein; für NH_4NO_3 ergibt sich daher aus der Tabelle $0,07 \cdot 100/35 = 0,2 \text{ g } \text{NH}_4\text{NO}_3$; oder für $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: $0,07 \cdot 100/21,2 = 0,33 \text{ g}$ usw.

d) Zur Umrechnung der bei verschiedenen Temperaturen und Luftdrücken abgelesenen *Kohlensäurevolumina*, die bei Vergärungen erhalten werden, auf 0° und 760 mm dient die von KLUYVER gegebene Tab. XXV. Und zwar werden vom abgelesenen CO₂-Volumen die auf dieses umgerechneten Prozentzahlen abgezogen. Z. B.: Das abgelesene Volumen beträgt 39 ccm bei 21° und 740 mm. Es sind daher $9,6 \cdot 39/100 = 3,7$ ccm abzuziehen. Das CO₂-Volumen bei 0° und 760 mm beträgt also 35,3 ccm.

Tabelle XXV.

Temperatur ° C	Luftdruck in mm Quecksilber					
	730	740	750	760	770	780
11	7,7	6,4	5,1	3,9	2,6	1,3
12	8,0	6,7	5,4	4,2	2,9	1,7
13	8,3	7,1	5,8	4,5	3,3	2,0
14	8,6	7,4	6,1	4,9	3,6	2,4
15	8,9	7,7	6,4	5,2	3,9	2,7
16	9,3	8,0	6,8	5,5	4,3	3,0
17	9,6	8,3	7,1	5,9	4,6	3,4
18	9,9	8,6	7,4	6,2	4,9	3,7
19	10,2	9,0	7,7	6,5	5,3	4,0
20	10,5	9,3	8,0	6,8	5,6	4,4
21	10,8	9,6	8,3	7,1	5,9	4,7
22	11,0	9,8	8,6	7,4	6,2	4,9

2. Leitlinien der Protokollführung.

a) **Protokollierung von Gärversuchen.** Dieselbe hat stets möglichst genau und unter Berücksichtigung aller in Frage kommender Faktoren zu geschehen. Widersprechende Angaben in der Literatur oder ebensolche eigene Befunde, schlechte Reproduzierbarkeit von Ergebnissen usw. sind vielfach auf mangelhafte Protokollierungen zurückzuführen, indem nicht alle einzelne Faktoren, die von Bedeutung sein können, notiert wurden. Bei der Protokollierung der Gärversuche sind folgende Punkte zu berücksichtigen:

α) Angaben über die Herkunft und Vorbehandlung der verwendeten Kulturen; und zwar: Art der Aufbewahrung der Stammkultur, Alter der Impfkultur und Art der Kultivierung (Nährboden, Temperatur usw.); vgl. auch unter b).

β) Die Zusammensetzung des Gärsubstrates ist stets möglichst genau zu notieren; so z. B. auch die Zusammensetzung der ver-

wendeten Nährsalze (Krystallwassergehalt), die Herkunft derselben (Bezugsquelle, Herstellerfirma), deren Reinheitsgrad usw.

γ) Die *Art der Herstellung des Gärsubstrates* ist gleichfalls kurz zu beschreiben, denn vielfach kann es von Einfluß sein, in welcher Reihenfolge oder in welcher Form (gelöst oder in festem Zustand) Nährsalze zugesetzt werden¹. Ferner sind Angaben über die *Art der Gärgefäße* (Herstellerfirma, Zusammensetzung des Glases) sowie über die *Art der Sterilisation* der Substrate zu machen.

δ) *Gärverlauf*. Man vermerkt die Temperatur (auch eventuelle Schwankungen derselben), Beginn der Gärung, Vornahme von Zusätzen und sonstige Operationen (Rühren, Schütteln usw.); ferner Aussehen der Kultur, Beobachtungen über das Wachstum der Organismen; Änderungen im Aussehen des Gäransatzes (Sedimentierungen usw.); Zeitpunkt des Versuchsabbruches, Art des Versuchsabbruches usw.

ε) Die *Art der Aufarbeitung der Gärversuche* ist gleichfalls mit allen notwendigen Einzelheiten zu vermerken².

b) **Protokollführung über die Kulturen.** a) *Anlegung eines Kataloges der Organismen*. Jede Kultur erhält zweckmäßigerweise eine fortlaufende Nummer und wird in einem Katalog geführt, in dem der Name der Kultur, die Bezugsquelle³ bzw. bei selbstgezüchteten Kulturen die Fundstelle und Art der Reinzüchtung vermerkt wird.

β) *Anlegung der Züchtungsprotokolle für die einzelnen Kulturen*. Es sind hier über die in Kultur gehaltenen Organismen fortlaufend etwa folgende Daten einzutragen: Zusammensetzung des Nährbodens für die Kultivierung, Art und Zeitpunkt der Fortzüchtung

¹ Vgl. z. B. BERNHAUER und IGLAUER: Biochem. Z. 286, 45 (1936).

² Vgl. diesbezüglich auch BERNHAUER: Einführung in die organisch-chemische Laboratoriumstechnik, S. 117. Berlin: Julius Springer 1934.

³ *Anschriften einiger Sammlungen von Mikroorganismen*: American Type Culture Collection, Washington, D. C. 3900 Reservoir Road (U. S. A.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Javalaan 4 (Holland). Prof. Dr. E. PRIBRAMS mikrobiologische Sammlung, vorm. KRALS bakteriologisches Museum, Wien IX/2, Michelbeuergasse 1a (Österreich).

Institut für Gärungsgewerbe, Berlin N 65, Seestraße 13 (Deutschland). Bakteriologisches Institut der preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft. Kiel, Prüne 48 (Deutschland).

Als weitere Bezugsquelle kommen naturgemäß die mit den gewünschten Organismen arbeitenden Autoren in Frage.

(Überimpfung auf frisches Substrat¹), Änderungen im Substrat, Wechselüberimpfungen, Temperatur während der Entwicklung und Aufbewahrung der Kulturen, sowie deren Dauer; Beobachtungen über das Wachstum der Organismen und über Änderungen im morphologischen und physiologischen Verhalten; Eintragungen betreffend die Überprüfung der Gärkraft der Kulturen.

Vielfach erhält man von einer Stammkultur durch Züchtungen (z. B. aus einzelnen Zellen oder Sporen), durch Passagen (Gewöhnung an besondere Substrate) usw. Subkulturen, die dann als eigene Kulturen unter einer besonderen Nummer fortgeführt werden können; auch hier müssen alle Wege und einzelnen Etappen, die zur Gewinnung solcher Kulturen geführt haben, genau vermerkt werden.

¹ Die Proberöhren und Kulturgefäße mit den fortgezüchteten Stammkulturen sind stets genau zu beschriften: Name, Nr. der Sammlung, abgekürzte Bezeichnung des Nährbodens, Datum der Abimpfung (vgl. auch S. 32).

Nachtrag.

Zu Seite 48. Zur Kultivierung in indifferenten Gasatmosphäre wurde auch die Anwendung einer gasdicht verschließbaren Apparatur empfohlen, aus der die Luft durch Wasserstoff verdrängt wird. Diesen entwickelt man in dem Gerät durch Einwirkung von Schwefelsäure auf Chrom. Das entstehende Chromsulfat bindet die letzten Reste des Sauerstoffes¹. Ferner sei auch auf andere neuere Methoden der Anaerobenzüchtung hingewiesen².

Zu Seite 51. Theorien der Enzymadaptation: Gegenüber der von KARSTRÖM vertretenen Anschauung hält QUASTEL adaptive und konstitutive Enzyme nicht für verschiedene Klassen; diese sollen vielmehr gewissermaßen die Grenzen darstellen, zwischen denen die Enzyme einer Zelle variieren können³. Nach YUDKIN⁴ sollen inaktive Enzymvorläufer in den Zellen vorhanden sein, aus denen sich auf Grund des Massenwirkungsgesetzes in Anwesenheit des betreffenden Substrates die aktiven Enzyme bilden. KOCHOLATY und WEIL⁵ kombinieren die beiden obenerwähnten Theorien folgendermaßen: Der Enzymvorläufer von YUDKIN soll mit dem kolloidalen Träger (Apoferment, vgl. S. 126) identisch sein, der mit verschiedenen prosthetischen Gruppen im Gleichgewicht steht. Durch äußere Einflüsse werden diese Gleichgewichtszustände gestört, und es findet eine Vereinigung mit anderen aktiven Gruppen unter Bildung neuer Enzyme statt.

Über eine enzymatische Adaption im Sinne KARSTRÖMS bei der Vergärung von d-Arabinose durch Vertreter der Coli-Aerogenes-Gruppe berichten KOSER und VAUGHAN⁶.

Zu Seite 52. Substratwechsel zur Regenerierung des Gärvermögens: Eine Nährlösung zur physiologischen Regeneration von Mikroorganismen hat ZELLER angegeben⁷.

Zu Seite 56. Modifikation der Gramfärbung (CLAUDIUS-Färbung): An Stelle der wenig haltbaren Gentianaviolettlösung wird Methylviolettlösung und an Stelle von Jod Pikrinsäure ver-

¹ ROSENTHAL, L.: J. Bact. **34**, 317 (1937).

² MÜLLER: C. Bact. I **140**, 66 (1937). — KOSCHUCHAROF: C. Bact. I **140**, 69 (1937).

³ QUASTEL: Enzymologia **2**, 37 (1937).

⁴ YUDKIN: Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. **13**, 93 (1938).

⁵ KOCHOLATY und WEIL: Bioch. J. **32**, 1696 (1938).

⁶ KOSER und VAUGHAN: J. Bact. **33**, 587 (1937).

⁷ ZELLER, A.: Bio. Z. **300**, 82 (1938).

wendet. Die Färbung zeichnet sich durch besondere Haltbarkeit aus. Reagenzien: I. wäßrige Methylviolettlösung. II. Pikroeosin: Zu 100 ccm Magnesiapikrat¹ gibt man 5 ccm einer 1%igen wäßrigen Lösung von Eosin sowie 0,5 ccm Phenol liquid. III. Pikrinanilin: 100 ccm Anilinöl mit 10 g Pikrinsäure versetzt. Vorgang: Nach Abflambieren 1 Minute Methylviolett, Abspülen mit Wasser, 2—3 Minuten Pikroeosin, Abtrocknen mit Filtrierpapier entfärben mit Pikrinanilin bis zum Verschwinden der dunkelvioletten Farbe, Abspülen mit Xylol, Abtrocknen mit Filtrierpapier. Grampositive Zellen sind blau, gramnegative eosinrot².

Zu Seite 92. Der Biosgehalt der Hefe ist besonders bei Beginn der Gärung sehr hoch und nimmt dann periodisch ab, wobei einige Maxima und Minima durchlaufen werden. Durch Züchtung biosarmer Hefen auf biosreicher Würze gelingt es nicht, den Biosgehalt in denselben zu steigern³. Extraktbios und Hefebios dürften daher nicht identisch sein⁴.

Als Wuchsstoff für den Diphtheriebacillus wirkt auch Pimelinsäure⁵.

Zu Seite 93. Bei der Untersuchung des Einflusses der Komponenten des Vitamin B₁ auf das Wachstum von Torulaarten konnten sehr große Verschiedenheiten, abhängig von der Hefeart, beobachtet werden⁶.

Zu Seite 98. Hefeaussteute: Bezüglich der Assimilation verschiedener Aminosäuren konnte gezeigt werden, daß von den normalen C₂-C₈-Säuren die Endglieder nur schlecht aufgenommen werden. Einführung einer Methylgruppe in α -Stellung bewirkt, daß die Säure nicht mehr aufgenommen werden kann. Asparagin und Asparaginsäure werden besonders gut assimiliert⁷.

Es sei auch noch erwähnt, daß keine wesentlichen Unterschiede in der Zusammensetzung des Eiweißes bei Bierhefen und technisch gezüchteten Torulahefen (Sulfitablauge, Holzzucker u. a.) bestehen⁸.

Zu Seite 100. Durch Lüften der gärenden Würze während der Bierbereitung läßt sich die Ausbeute an Bierhefe beträchtlich

¹ 0,54%ige wäßrige Pikrinsäurelösung wird mit 2 g MgO einige Minuten gekocht, abgekühlt und filtriert.

² JENSEN: C. Bact. I **139**, 333 (1937).

³ ENDERS, C und E. HEGENDÖRFER: Bio. Z. **299**, 346 (1938).

⁴ NIELSEN, N.: C. R. Ser. Physiol. **21**, 163 (1935).

⁵ MÜLLER, J. H.: J. Biol. Chem. **119**, 121 (1937).

⁶ ROBBINS W. J. und F. KAVANAGH: C. 1938 II 4257.

⁷ HARTELIUS: Bio. Z. **299**, 317 (1938).

⁸ FINK, H. und F. JUST: Bio. Z. **300**, 84 (1938).

steigern, wobei das Bier eiweißärmer wird, ohne daß im übrigen die Qualität desselben leidet¹.

Zu Seite 101. Der Vitamin B₁-Gehalt der Hefe wird durch Züchtung derselben auf verschiedenen Medien (Bierwürze, Melasse, Glucose) merklich beeinflusst. Den größten Vitamin B₁-Gehalt wies eine auf Malzwürze gezogene Hefe auf².

Zu Seite 104. Bestimmung des Fettgehaltes in der Trockensubstanz: Die bei 60—70° getrocknete und fein zerriebene Pilzmasse wird in einer Extraktionshülse eingewogen und 6 Stunden mit Tetrachlorkohlenstoff extrahiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird der Fettrückstand in 5 ccm Ligroin aufgenommen. Dann fügt man 4 ccm Citratpuffer (p_H 4,9) und 50 mg Rizinuslipase hinzu. Nach 6stündigem Schütteln bei 20° werden 10 ccm 96%iger Alkohol zugesetzt und die gebildeten Fettsäuren nach Zugabe von 10 ccm Äther mit n/10 KOH titriert (Phenolphthalein). Durch Testversuch wird der Verbrauch an Lauge für Puffer und Ferment ermittelt. Fehlerquelle bis zu 20 mg ± 5%³.

Zu Seite 107. Mittels eines geeigneten Trocknungsverfahren kann man aus Bierhefe Präparate erhalten, die überwiegend aus lebenden Zellen bestehen und als Anstellhefe empfohlen wurden⁴.

Zu Seite 118. Vgl. Nachtrag zu Seite 98, Hefeausschüttelung.

Zu Seite 126. Vgl. auch die Aktivierung bzw. Hemmung der Carboxylase durch verschiedene Salze⁵. Siehe ferner die Beeinflussung der enzymatischen Synthese von Co-Carboxylase durch Natriumfluorid und Pyruvinsäure⁶.

Die Co-Carboxylase kann auch als prosthetische Gruppe eines dehydrierenden Fermentes wirken, wobei aber keineswegs Decarboxylierung stattfinden muß⁷.

Der Gehalt der Hefe an Co-Carboxylase kann durch Züchtung derselben unter Zusatz von Vitamin B₁-Hydrochlorid gesteigert werden⁸. Auch Trockenhefe vermag unter geeigneten Bedingungen Co-Carboxylase zu synthetisieren⁹.

¹ FINK, H. und F. JUST: Wochenschr. f. Brauerei **54**, 349 (1937).

² PAVCEK, PETERSON und ELVEHJEM: Ind. Eng. Chem. **30**, 802 (1938).

³ REICHEL, L. und W. REINMUTH: Bio. Z. **299**, 359 (1938).

⁴ KOCH, R.: Wochenschr. f. Brauerei **54**, 329 (1937).

⁵ TAUBER, H.: J. Biol. Chem. **125**, 191 (1938).

⁶ LIPSCHITZ, POTTER und ELVEHJEM: J. Biol. Chem. **124**, 147 (1938).

⁷ LIPMANN, F.: Enzymologia **4**, 65 (1937).

⁸ KINERSLEY, H. W. und R. A. PETERS: Bioch. J. **32**, 697 (1938).

⁹ LIPSCHITZ, M. A., VAN RENSSSELLAER POTTER und C. A. ELVEHJEM: Bioch. J. **32**, 474 (1938).

Zu Seite 133. Es gelang auch, Glycerinaldehyd-Phosphorsäure mittels Hydrazin und neuerdings auch mittels Bisulfit abzufangen¹.

Zu Seite 140. Bei der Oxydation des hydrierten Co-Enzym I ist ein bestimmtes Ferment wirksam, das als Co-Enzymfaktor bezeichnet wurde².

Zu Seite 142. Isomerisierung von Phosphorsäureestern: Es sei hier auch noch auf die Auffindung der Phospho-Glucomutase verwiesen, die Glucose-1-Phosphorsäure (entstanden durch Phosphorylierung von Glykogen mittels Hefeextrakt³) in Glucose-6-Phosphorsäure umwandelt⁴.

Zu Seite 143. Nach neueren Befunden muß der alkoholischen Gärung durch lebende Hefe keineswegs eine Glykogensynthese vorangehen⁵.

Zu Seite 163. Die Art der gebildeten Milchsäure ist auch sehr vom verwendeten Bakterienstamm abhängig. So bildet *L. acidophilus* Stamm S die d-Säure, Stamm R die dl-Säure⁶.

Die Milchsäure-Racemase aus *Cl. butylicum* wurde neuerdings näher untersucht. Der Mechanismus der Reaktion beruht möglicherweise in einer Dehydrogenasewirkung, wobei mangels eines Acceptors Racemisierung stattfindet⁷.

Milchsäureerzeugung durch Pilze in submerser Kultur: Die Fähigkeit von *Rhizopus oryzae* zur Milchsäurebildung kann besonders unter Anwendung des Verfahrens der rotierenden Gärtrommel gut ausgenützt werden. Innerhalb 35 Stunden erzielte man so eine Ausbeute von rund 70%. Daneben entstanden 8% Äthanol⁸.

Zu Seite 168. Zur Bestimmung von Milchsäure in Gegenwart von Methylglyoxal entfernt man zweckmäßigerweise letzteres durch Oxydation mittels H_2O_2 ⁹.

¹ MEYERHOF, M. O.: Bull. Soc. Chim. Biol. **20**, 1033, 1345 (1938).

² DEVAN, J. G. und D. E. GREEN: Biochem. J. **32**, 626, 1200 (1938).

³ CORI, G. T., COLOWICK und C. F. CORI: J. Biol. Chem. **123**, 375 (1938).

⁴ Dieselben, ebenda **124**, 543 (1938).

⁵ GODA, T.: Bio. Z. **298**, 431 (1938).

⁶ KOPELOFF und KOPELOFF: J. Bact. **33**, 331 (1937). — Die Bezeichnung S und R leitet sich von morphologischen Verschiedenheiten ab (S = smooth und R = rough).

⁷ CHRISTIENSEN, W. B., PETERSON, W. H. und M. J. JOHNSON: J. Biol. Chem. **123**, Sci. Proc. 21 (1938).

⁸ WARD, G. E., LOCKWOOD, L. B., TABENKIN B. und P. A. WELLS: Ind. Eng. Chem. **30**, 1233 (1938).

⁹ BAUER, E. und F. ZIEGLER: H. S. **247**, 1 (1937).

Zu Seite 169. Weiterer Abbau der Milchsäure: In Milchsäurebakterien (z. B. *L. SAKÉ* oder *L. plantarum*, *Leuconostocarten* u. a.) wurde eine Milchsäure-Dehydrogenase festgestellt. Unter den Oxydationsprodukten wurden bis 60% Brenztraubensäure aufgefunden¹.

Zu Seite 170. Die Mannitgärung des Invertzuckers wird durch hohes p_{H} des Mediums begünstigt. Bei der Vergärung der Glucose überwiegt unter diesen Bedingungen die Alkoholbildung. Sorbose wird nicht zu Sorbit reduziert².

Zu Seite 176. Phosphatbestimmung: Man bestimmt zunächst das anorganische Phosphat und nach Zerstörung der organischen Substanz durch Oxydation das Gesamtposphat auf colorimetrischem Weg. Die Differenz ergibt das organisch gebundene Phosphat³.

Zu Seite 178. Note 8. Vgl. dazu auch WOOD, ERB und WERKMANN: Iowa State Coll. J. Sci. **11**, 287 (1936).

Zu Seite 182. Phosphoglycerinsäure wird durch *Escherichia* und *Aerobacter* aus Glucose und Phosphat in Gegenwart von Toluol angehäuft⁴.

Gemäß einem abgeänderten Schema der Coligärung soll Essigsäure zu Acetaldehyd reduziert und dieser über Acetoin in 2,3-Butylenglykol umgewandelt werden. Auch zugefügte Essigsäure wird in dasselbe übergeführt⁵. Diese Reaktion führt auch *Aerobacter polymyxa* durch⁶.

Zu Seite 183. Bei der Bernsteinsäurebildung durch *Bact. coli* konnte durch Erhöhung des CO₂-Druckes eine Steigerung der Ausbeute erzielt werden⁷.

Zu Seite 185. Die Fähigkeit, Acetoin zu bilden bzw. abzubauen, wurde als Unterscheidungsmerkmal in der *Coli*-*Aerogenes*-Gruppe angewendet⁸, doch scheint dieses Vermögen sehr von den Kulturbedingungen abhängig zu sein⁹.

¹ KATAGIRI, H. und KITAHARA, K.: Biochem. J. **32**, 1654 (1938).

² SCHOEN und ERAS: Enzymologia **4**, 198 (1937).

³ MARTLAND, M. und R. ROBISON: Biochem. J. **20**, 847 (1926).

⁴ STONE und WERKMAN: Iowa State Coll. J. Sci. **11**, 1 (1936).

⁵ REYNOLD und WERKMAN: J. Bact. **33**, 603 (1937). — REYNOLD, JACOBSSON und WERKMAN: ebenda **34**, 15 (1937).

⁶ STAHLY: Iowa State Coll. J. Sci. **11**, 110 (1936).

⁷ ELSDEN, S. R.: Biochem. J. **32**, 187 (1938).

⁸ TOMIYASU: C. **1938** II, 4259.

⁹ REYNOLD und WERKMAN: Arch. Mikrobiol. **8**, 149 (1937).

Zu Seite 194. Der Zusatz von Asparagin zu Maismaische bewirkt die Bildung größerer Mengen Butanol an Stelle von Buttersäure¹.

Zu Seite 195. Gärungserreger: Die durch einen Ultravirus hervorgerufenen Schleimgärungen können durch geeignete Vorzüchtung der Bakterien vermieden werden².

Als Ausgangsstoff für die Butanol-Acetongärung kommen auch hydrolysierte Haferspelzen in Gegenwart von etwas Kornmaische in Betracht³.

Butanol-Acetongärung des Holzzuckers mittels *Cl. butylicum* und *Cl. felsineum*, wobei das erstere neben Butanol größere Mengen Isopropanol erzeugt (hauptsächlich aus der in den Hydrolysaten vorhandenen Essigsäure⁴).

Zu Seite 201. Die butylogenen Bakterien vermögen auch Acetoin zu bilden; einige von ihnen reduzieren es weiter zu 2,3-Butylenglykol⁵.

Zu Seite 203. Eine Steigerung der Isopropanolausbeute aus Glucose wurde durch Zusatz von Buttersäure erzielt⁶.

Zu Seite 207. Note 6. Vgl. auch SEVERSON, G. M.: Iowa State Coll. J. Sci. 11, 103 (1936).

Zu Seite 223. Eine zusammenfassende Übersicht des Chemismus der Dehydrierungsvorgänge gibt SZENT-GYÖRGY: Bull. Soc. Chim. Biol. 20, 846 (1938).

Zu Seite 226. Bei der Untersuchung verschiedener organischer Substanzen hinsichtlich ihrer Angreifbarkeit durch Essigbakterien zeigte sich, daß Glucose, Milchsäure und die Säuren des THUNBERG-WIELAND-Schemas stets ungefähr gleich schnell angegriffen werden. Verschiedene Alkohole werden verschieden rasch oxydiert, was auf eine weitgehende Spezifität der Alkoholdehydrasen hindeutet⁷.

¹ BROWN, R. W., G. L. STAHLY und C. H. WERKMAN: Iowa State Coll. J. Sci. 12, 245 (1938).

² A. P. 2 132358 (1938).

³ UNDERKOFER, FULMER und REYMAN: Ind Eng. Chem. 29, 1290 (1937).

⁴ SJOLANDER, N. O., LANGLYKKE, A. F. und W. H. PETERSON: Ind. Eng. Chem. 30, 1251 (1938).

⁵ BROWN, R. W., STAHLY, G. L. und C. H. WERKMAN: Iowa State Coll. J. Sci. 12, 245 (1938).

⁶ OSBURNE, O. L., BROWN, R. W. und WERKMAN C. H.: Iowa State Coll. J. Sci. 12, 275 (1938).

⁷ TANAKA: J. Sci. Hiroshima Univ. B (2) 3, 1 (1938).

Zu Seite 229, Note 2. Neuerdings konnte gezeigt werden, daß sogar 25%ige Glycerinlösungen innerhalb 12 Tagen fast quantitativ umgesetzt werden. 15%ige Lösungen verarbeitet *A. suboxydans* in 3—4 Tagen. Maßgebend ist hierfür eine strenge Kontrolle des p_{H} -Wertes der nicht unter 4,5 sinken darf¹.

Zu Seite 242. Neben der Aero-Gluco-Dehydrase wurde bei *Fusarium* auch eine — allerdings schwächer wirksame — Aero-Pentose-Dehydrase nachgewiesen².

Zu Seite 259. Vgl. dazu Nachtrag zu Seite 163, letzter Absatz.

Zu Seite 268 (letzter Absatz). Aus Hefesaft können Enzymzubereitungen gewonnen werden, die Glucosephosphorsäure zu Phosphogluconsäure, Phosphoketogluconsäure und Phosphopentonsäuren zu oxydieren vermögen; auch die Anwesenheit von Phosphoerythronsäure wurde wahrscheinlich gemacht. Mittels intakter Zellen konnte dieser Abbau nicht verwirklicht werden³.

Zu Seite 270. Bei der Aufbewahrung von Nährböden sind Insekten, besonders Fliegen fernzuhalten, da sie Milbenträger sein können. Durch das Eindringen von Milben werden die Kulturen mit fremden Mikroorganismen verunreinigt. Die Vernichtung dieser Schädlinge gelingt am besten mit p-Dichlorbenzol⁴.

¹ BUTLIN, K. R.: *J. Soc. Chem. Ind.* **57**, 463 (1938).

² HAYASIDA, A.: *Bio. Z.* **298**, 169 (1938).

³ DICKENS: *Biochem. J.* **32**, 1626, 1645 (1938).

⁴ PEASE, D.: *J. Bact.* **33**, 619 (1937).

I. Allgemeines Sachverzeichnis.

Die kursiv gesetzten Zahlen verweisen auf jene Seiten, auf denen der Gegenstand ausführlicher behandelt ist. — Hinsichtlich der Gewinnung, des Nachweises, der Bestimmung und Umwandlung der wichtigsten Gärprodukte vgl. spezielles Sachverzeichnis.

- Abbauprozesse, Einheitlichkeit der 226.
Abfangen von Zwischenprodukten 10, 123.
Abflambieren 37.
Abfüllapparat 271.
Abfüllbüretten 31.
Abfüllen von Nährböden 31, 271.
Absorption von Sauerstoff 48.
— — CO₂ 165.
Abwasserbakterien 57.
Acceptormethodik 223.
Acetaldehyd-Glyceringärung 9, 118.
Acetobacter aceti 68, 217, 219.
— acetosum 68.
— ascendens 68, 216, 221, 223.
— dioxyaeticum 52.
— glucenicum 23, 32, 52, 69, 215, 226, 232.
— orleanense 69, 216, 219, 226.
— oxydans 68.
— pasteurianum 68, 216, 217, 219, 221, 224, 225.
— peroxydans 223.
— rancens 68.
— Schützenbachi 69.
— suboxydans 68; 221, 223, 225, 227, 228, 230.
— — muciparum 232.
— vini acetati 69.
— xylinoide 69, 226.
— xylum 24, 69, 226, 230.
Acetol 152.
Aceton-Bakterium 186.
— Brenneri 22.
— Dauerhefe 107.
— Fabrikation 1, 3, 194, 205.
— Verwendung 3.
— Welterzeugung 3.
Acetongärung 3, 17.
— Chemismus 206.
— Durchführung 188, 204.
— Technologie 195, 205.
Acetonpräparate von Bakterien 217.
Acetophenon, Reduktion 151.
Acylolinkondensationen 7, 17, 125, 144, 185, 208.
— Chemismus 155.
Adaption, enzymatische 51, 283.
Adenylsäure 132, 142.
Adonit 7.
Adonose 7.
Aerobacter aerogenes 153, 167, 182, 187.
— cloacae 184.
— pectinovorum 181, 208.
— polymyxa 287.
Aerobacillus-Gruppe 21, 181, 185.
Aerobienkultur 48.
Aerogenes-Gruppe 21, 181, 186.
Aethanol 17, 23, 42.
— absolutes 115.
— Anhäufung 10.
— Erzeugung 113.
— Verwendung 2.
— Welterzeugung 2.
Aethanolgärung, Bedeutung 2.
— von Bakterien 21.
— — Essigbakterien 225.
— — Hefen 143.
— anderer Organismen 143.
— Umschaltung in Milchsäuregärung 170.
— Rohstoffe 113.
— Theorie 117.
Aethanol-Acetongärung 22, 204, 208.
— Chemismus 206.
— Technologie 205.
— Zwischenprodukte 205, 207.
Aethanol-Butanolgärung 204.
Aethanol-Butylenglykol-Gärung 21, 181, 184.
— Erreger 208.
Aethanol-Essigsäure-Glycerin-Gärung 10, 127.
Aethoxylbestimmung 184.
Agar-Agar 29.
Agarröhrchen 31.
Aktivatoren 14, 143, 126.

- Aktivität der Bakterien 227.
 β -Alanin 92.
 Aldehyde, ungesättigte, Hydrierung 154.
 Aldehydammoniak 140.
 Aldehydgluconsäure 17, 233.
 Aldehydimin 126.
 Aldehydmutase 128, 222.
 Aldehydrase 224.
 Aldolase 132 ff, 142, 200.
 Aldolkondensation 17, 134.
 — bei Buttersäuregärung 199, 208.
 Aldomedon 124.
 Aldosen, Oxydation 231.
 Aldosenbildung durch Essigbakterien 229.
 Alkannatinktur 103.
 Alkohol, Verwendung 2.
 — Oxydation durch Essigbakterien 223 ff.
 Alkohole, Hydrierung, ungesättigter 154.
 Alkoholdehydrase 224.
 Alkoholometer 113.
 Allescheria Gayoni 267.
 Alter der Bakterien, Bedeutung 227.
 American Type Culture Collection 59, 281.
 Aminosäuren 29.
 — Abbau durch Hefen 117, 118.
 — als Wachstoffsstoffe 92.
 — Z-Faktorwirkung 144.
 Amylalkohol 22, 115, 117.
 — aus Valeraldehyd 148, 149.
 Amyloverfahren 114.
 Anabolismus, oxydativer 254.
 Anaerobenapparate 28, 49.
 Anaerobenkultur 48, 284.
 Anaero-Glucosehydrase 231, 242.
 Androstendion 7.
 Aneurin 93, 126, 127, 142.
 Angärung 82.
 Anilin 154.
 Anilinwasser 55.
 Anisaldehyd 7, 146.
 Anoxydative Gärungen, Begriff 15.
 — — Durchführung 157.
 — — Erreger 15.
 Anreicherungsverfahren 45.
 Anserin 92.
 Anstellhefe, Reinigung 88.
 1, 4, 9, 10-Anthradichinon, Reduktion 150.
 Antiseptica, Wirkung auf die Gärung 114.
 Apiculatushefe 87.
 Apoferment 125, 126.
 Apparat nach Barcroft-Warburg 83.
 — — Birkinshaw-Raistrick 23.
 — — Faust-Heim 273.
 — — Illényi 83.
 — — Iterson-Kluyver 111.
 — — Janke und Kropaczy 83.
 — — Tamiya und Miwa 265.
 Arabinose, Oxydation 231.
 Arabit, Oxydation 230.
 Arabonsäure, Bildung 231.
 Arginin 92, 118, 131.
 Arrak 117.
 Arzneifläschchen 27.
 Asbestwolle, als Filtermittel 31.
 Ascorbinsäure 24, 127.
 Asparagin 40, 284.
 — als Faktor der Butylgärung 194, 288.
 Asparaginsäure 92, 179.
 Aspergillaceengärung 267.
 Aspergillusarten, Vorkommen 44.
 Aspergillus Awamorii 243.
 — candidus 243.
 — clavatus 267.
 — flavus 25, 70, 243.
 — fumaricus 24, 258.
 — glaucus 70.
 — itaenicus 13.
 — niger 24, 25, 70, 92, 238, 267.
 — oryzae 23, 70.
 — tamarii 244.
 Atmungsferment 223.
 Atmungsvorgänge 15.
 Aufarbeitungsraum 274.
 Aufbewahrung von Kulturen 50, 270.
 — — Nährböden 31, 270.
 Auffindung von Gärungsorganismen 43.
 Aufzucht 12, 215.
 Auramin 56.
 Ausgangsmaterialien 9.
 Ausglühen 37.
 Ausstrichpräparat 55.
 Austrocknen der Nährböden 49.
 Auswahl, natürliche 52.
 Auswahl der Organismen 12.
 Autoklav 37.
 — Handhabung 272.
 Autolyse 103.
 Avertin 7, 150.

- Babesschalen** 27.
Bacillus 59.
Bacillus aceto-aethylicus 22, 204, 208.
 — *asiaticus mobile* 21, 184.
 — *butylicus* 196.
 — *macerans* 22, 66, 186, 204, 208.
 — *megatherioides* 186.
 — *mesentericus* 64.
 — *polymyxa* 66, 208.
 — *subtilis* 63.
Bacterium coli 44, 64, 150, 153, 182, 183.
 — *dysenteritis* 184.
 — *Freundii* 182.
 — *lactis acidii* 158, 162, 163.
 — *parathyphosum* 182, 184.
 — *typhosum* 182, 184.
Bäckerhefe, Gewinnung 94.
 — **Produktion** 5.
 — **Reinigungsgärung** 45, 88.
 — **Triebkraft** 87:
 — **Untersuchung** 86.
 — **Verwendung** 5.
Bakterium, Charakterisierung 59.
Bakterien, Einteilung 59 ff.
 — **Nährböden** 34, 35, 38, 39.
 — **ruhende** 80, 81, 217.
 — **Züchtung** 81.
Bakteriendehydrasen, Aktivität der 227.
Bakterienmassen 81.
Bakterienzählkammer 57, 269.
Belüftungsapparatur 78, 94.
Belüftungsg. fäße 77.
Benzaldehyd, Acyloinkondensation 7, 144.
 — **Hydrierung** 150.
Benzil, Reduktion 152.
Benzinsynthese 19.
Benzoin 152.
Benzylalkohol 146.
Benzylidenacetonaldehyd 150.
Bergiusverfahren 18, 100, 114.
Berkefeldkerze 42.
Bertrandsche Regel 230.
 — **Einschränkung** 234.
Bestimmung, nephelometrische 91.
Bier, Alkoholgehalt 116.
 — **Extraktgehalt** 116.
 — **Geschichte** 17.
 — **Welterzeugung** 2.
Biere, obergärige 18, 116.
 — **untergärige** 18, 111.
Bierbrauerei 115.
Bieressig 23.
Bieressigbakterien 67, 214.
Bierhefe 58.
 — **Umwandlung in Trockenhefe** 100.
 — **Untersuchung** 86.
Biersaraine 64.
 — **Vorkommen** 44, 64.
Bierwürze 33.
 — **Anwendung** 33.
 — **Bestimmung der Wuchsstoffe** 91.
 — **Herstellung** 116.
 — **Vergärung** 116.
Bilanzversuche 9, 82.
Bios 92, 143, 284.
Biotin 92.
Bismarckbraun 55.
Blockierung der Enzyme 127.
Boerhaave-Verfahren 23, 220.
Bolus alba 31.
Branntwein 18, 117.
Brauereihefe 60.
 — **Verwertung** 5, 19.
Brennereiheden 18.
Bromal 7.
Brotnährböden 36.
Brutschrank 272.
Buchenholzspäne 218, 220.
Butanol 22.
 — **Fabrikation** 195.
 — **Verwendung** 3.
 — **Welterzeugung** 3.
Butanol-Acetongärung 3, 22, 185 ff.
 — **Aktivatoren** 14, 194.
 — **Ausgangsmaterialien** 195, 288.
 — **Bedingungen** 195.
 — **Chemismus** 201.
 — **Erreger** 195, 288.
 — **Technologie** 195.
 — **Theorie** 194.
 — **Verlauf** 193.
 — **Zwischenprodukte** 202.
Butanol-Aethanol-Gärung 204.
Butanol-Isopropanol-Gärung 22.
 — **Chemismus** 203.
Buttersäure, Fabrikation 196.
 — **im Silofutter** 164.
 — **Verwendung** 3.
 — **Welterzeugung** 3.
Buttersäurebakterien 22, 34, 158.
Buttersäuregärung 22, 196 ff.
 — **Ausgangsmaterial** 197.
 — **Chemismus** 199.
 — **Technologie** 197.

- Buttersäuregärung, Umschaltung
 der 170, 200.
 Butylgärung 17.
 — Chemismus 199.
 — Zwischenprodukte 198.
 Butylogene Bakterien, Anreicherung 185.
 — — Ausschaltung 88.
 — — Kultivierung 187.
 — — Nährböden 48.
 — — Reinzucht 186.
 — — Vorkommen 44.
 Calciumbestimmung 160.
 Candiolin 129.
 Caprinsäure 197, 200.
 Capronsäure 197, 200, 214.
 Caprylsäure 197, 200.
 Carbofuchsin 56.
 Carboligase 146, 155.
 Carboxylase 125, 142, 155, 285.
 — der Essigbakterien 225.
 Carboxylasemodelle 126.
 Casein 101.
 C-Bilanz 9, 83.
 Cedernöl 56.
 Cellophan-Blättchen 47.
 Cellulose, Nährböden 209.
 — Verzuckerung 114.
 Cellulosevergärer, Isolierung 209.
 — Vorkommen 44, 65.
 Cellulosevergärung 4, 22, 209.
 — Chemismus 213.
 — Gärprodukte 212.
 — techn. Bedeutung 212, 213.
 — Typen 212.
 Cellulosemedium 209.
 Cellulosesuspension, Darstellung
 209, 210.
 Cerisulfat 137.
 Chamberland-Kerze 42.
 Chamberland-Kölbchen 27.
 Chinizarin 151.
 Chinonatmung 221, 222.
 Chinone-Reduktion 153.
 Chlamydosporen 72.
 Chloralhydrat-Reduktion 7, 149.
 Chlorbenzaldehyd 7, 146.
 Chloroform 43.
 Chromschwefelsäure 30.
 Cilien 59.
 Citraconsäure 4.
 Citral 150.
 Citrobacter 182.
 Citromycesarten 24, 44, 62.
 Citronellal 150.
 Citronensäure, Verwendung 5.
 — Welterzeugung 4.
 Citronensäurebildner, Auswahl 245.
 Citronensäuregärung 3, 17, 24.
 — Bedingungen 248.
 — Chemismus 248.
 — Einfluß von $MgCl_2$ 247.
 — Erreger 248.
 — Durchführung 245.
 — Technologie 249.
 — Zwischenprodukte 250.
 C_3 -Körper 16, 226.
 Clostridium aceto-butylicum 65,
 188, 194, 195.
 — butylicum 66, 188, 191.
 — felsineum 203.
 Clostridiumformen 61.
 CO_2 -Bestimmung 165.
 — Mikromethode 111.
 Co-Carboxylase 126, 127, 142, 285.
 Co-Enzymfaktor 286.
 Co-Ferment 126, 127, 142.
 Co-Phosphorylase 132, 140.
 Co-Wachsstoff 93.
 Co-Zymase 135, 140, 142, 223.
 Co-Zymasegehalt 140.
 Coli-Aerogenes-Gärung 180 ff.
 Colibakterien 154, 180.
 — Herstellung von Massenkultu-
 ren 180.
 Coligärung 17.
 — Chemismus 182.
 — Umschaltung 170.
 Columella 67.
 Conidiosporen 53, 234.
 — Aufbewahrung 235.
 Coniophora cerebella (FALCK) 25.
 Cornetsche Pinzette 56.
 C-Quellen 13.
 Crotonaldehyd 150, 154, 203.
 Crotonsäure 203.
 Crotylalkohol 150, 154.
 Cychite 92.
 Cytochrom 99, 223.
 Dampftopf 37.
 — Handhabung 271.
 Darren 115.
 Dauerkulturen 50.
 Dauerpräparate 56.
 Decarboxylierung 124, 125.
 Deckgläser, Reinigung 54.
 Degeneration 50, 215, 248.
 Degenerationsfett 105.

- Dehydrase I 140.
 Dehydrase II 140.
 Dehydrase der Essigbakterien 222, 231, 288.
 Dehydrierung 16, 288.
 — durch Butylbakterien 201.
 — — Essigbakterien 222.
 — — Hefen 268.
 Dehydrierungstheorie 223.
 Delbrück-Verfahren 100.
 Dephlegmation 115.
 Destillation 84.
 Destillationsapparate 273.
 — für analytische Zwecke 189.
 Diastase 113.
 — bei Milchsäurebakterien 185.
 — — Schimmelpilzen 237.
 Dihydrocozymase 140.
 Diketo adipinsäure 252.
 Dimedon 124.
 Dimethylbrenztraubensäure 265.
 m-Dinitrobenzol, Reduktion 154.
 Dismutation 16, 223.
 — von Triosephosphat 135, 142.
 Dissoziation 50.
 Doppelbindungen, Hydrierung 153, 156.
 Dreheisigbildner 220.
 Drigalski-Schalen 26.
 Druckdestillation von Alkohol 115.
 Druckperkolatoren 114.
 Druckverfahren 24.
 Dulcit, Oxydation 229.
 Dünger 64.
 — Speckigwerden 65.
 Durchlüftungsverfahren 227, 237.
 Dysenteriebacillen 93.

 Einzelkultur 45.
 Einhorn-Gärröhrchen 109.
 Eintauchessigbildner 220.
 Eisen-Ammonium-Alaun 255.
 Eiweiß 30.
 Eiweißfällung 84, 96, 120, 130, 226.
 Eiweiß-Lücke 100.
 Eiweiß-Schlempe-Verfahren 19, 101.
 Eiweiß-Synthese 100.
 Embden-Meyerhof-Schema 172.
 Embden-Ester 133.
 Emmentaler Käse 21.
 Endomyces vernalis 5, 33.
 — Verfettung 106.
 Endosporen 67.
 Enolase 141, 142.

 Entbitterung von Bierhefe 19.
 Enteiweißung 96, 120, 131, 226.
 Entfetten von Glas 54.
 Entwicklung der Gärungschemie 17.
 Entwicklungsformen, ultramikroskopische 59.
 Enzyme 99, 170.
 — adaptive 51, 283.
 — Chemie der 126.
 — konstitutive 51, 283.
 Erdkulturen 50.
 Erdnußschalen 21.
 Erlenmeyerkolben 28, 72, 74.
 Erreger, anoxydativer Gärungen 15.
 — oxydativer Gärungen 15.
 Erythrit 230.
 Erythrulose 230.
 Escherichia 182.
 Essig als Substrat 44.
 — Herstellung 219.
 Essigbakterien 15, 17, 65, 88.
 — Aufzucht 215, 216.
 — Ausschaltung 88.
 — Gewöhnung an Substrate 215.
 — Herstellung von Acetonpräparaten 217.
 — — — Impfkulturen 215.
 — — — Massenkulturen 216.
 — — — ruhenden Bakterien 217.
 — Isolierung aus Bier 214.
 — Nährböden 49.
 — Vorkommen 44.
 Essigbakterien-Dehydrase 23, 222.
 Essigdarstellung 23.
 Essiggärung, Abfangen von Acetaldehyd 220.
 — Ausgangsmaterialien 219.
 — Chemismus 222.
 — Technologie 219.
 — Zwischenprodukte 220.
 Essighaut 23, 219.
 Essigsäure 17, 21.
 — Verwendung 3.
 — Welterzeugung 3.
 Essigsäure-Acetattuffer 125.
 Essigsäure-Glycerin-gärung 164, 170.
 Essigsäure-Mannitgärung 165, 171.
 Eudiometer 84, 109, 111, 136.
 Eulers-Faktor 14.
 Exkreme, als Fundort für Bakterien 44.
 Exiguus-Hefen 59, 87.

- Exoporen 67.
 Extraktion 84, 85.
 Extraktionsapparate 273.
 — nach Schmalzfuss 104.
- Fadenbakterien** 59.
 Faktor Z 14, 143.
 Faktoren der Gärprozesse 12, 13.
 Färbemethoden 55.
 Farbstoffe 55.
 Farbstofflösungen 269.
 Faulschlamm 65.
 Faust-Heim-Apparat 120.
 Federstrichkultur 45, 46, 89.
 Fehlingsche Lösung 160.
 Ferment, Gelbes 127, 140.
 Fermente, Extrahierbarkeit der 58.
 Fernbachkolben 74, 104.
 Fettbäume 105.
 Fetterzeugung 5, 19.
 Fettgehalt, Bestimmung 104.
 Fettreagens 102.
 Fettsäuren, höhere 197.
 Fettsynthese aus Kohle 6, 19.
 — durch Hefe und Oidien 102, 104.
 — Mechanismus 105.
 Feuchte Kammer 28, 46.
 Feuchtigkeitsgehalt, Regelung 82.
 Filterkerzen 78.
 Filtration von Flüssigkeiten 30, 42.
 — von Gasen 37.
 — — Nährböden 30.
 Fixierung von Präparaten 53.
 Flavin-Enzym 156.
 Fleischextrakt 29.
 Fleisch-Peptonwasser 35.
 Fleischwasser 35.
 Flockenmilchsäurebakterium 87, 88.
 Foliencolorimeter 30.
 Formaldehyd 42, 224.
 — Hydrierung 150.
 Formicodehydrase 224.
 Formolgrad 96, 100.
 Fortzüchtung 47, 49.
 Fremdinfection 49.
 Freudenreichkölbchen 27.
 Fructose 21.
 — im Holzzucker 114.
 — Vergärbarkeit durch Hefe 117.
 — Vergärung der 171.
 Fructosemonophosphat 131.
 Fuchsinlösung 56, 87.
 Fumarsäuregärung 17, 24, 254 ff.
 — Bedingungen 258.
 — Chemismus 260.
- Fumarsäuregärung, Erreger 258.
 — Zwischenprodukte 259.
 Fungi imperfecti 59.
 Furfuralkohol 150.
 Furfurol 115, 150.
 Fusariengärungen 266.
 Fusarium lini 143.
 Fuselöle, Bestandteile 115.
 — Entstehung 117, 118.
 — Verwendung 2.
 Futterhefe 5, 19, 100.
 Futtermittelerzeugung 4.
- Galaktose** 7.
 — im Holzzucker 114.
 — Vergärbarkeit durch Hefe 117.
 Galaktose-Zymase 51.
 Galaktonsäure 231.
 Gallensäure, Reduktion 153.
 Gallerten 45.
 Gasatmosphäre, indifferente 48, 81.
 Gasentwicklung 82.
 Gasmesser 94.
 Gasmessung 195.
 Gasometer 84.
 Gaswaschflaschen 72, 77.
 Gay-Lussac-Gleichung 117.
 Gäraroma 115.
 Gäraufsätze 72.
 Gärführung 14, 82.
 Gärgase 82.
 Gärgefäße 72 ff.
 Gärgeschwindigkeit 12, 53.
 Gärkammer 82.
 — Einrichtung 272.
 Gärkraft, Bestimmung bei Hefe 109.
 Gärprodukte, flüchtige 84.
 — gasförmige 83, 84.
 — nichtflüchtige 84, 85.
 — Trennung bei der Butanol-Acetongärung 189.
 Gärprozesse, Bedeutung 2.
 — Faktoren, äußere 13.
 — — innere 12.
 — Umschaltung 10.
 Gärrohrechen 109, 124, 125.
 Gärsubstrat, Herstellung 81.
 — Sterilisierung 81.
 Gärtemperatur 13, 82.
 Gårtrommel 23, 79, 227, 243.
 Gårtrommelverfahren 227.
 Gärung, anoxydative 15.
 — Charakteristik 15.
 — oxydative 15.

- Gärung, alkoholische, bei der Citronensäurebildung 252.
 — — bei der Fumarsäurebildung 260.
 — — Beziehung zur Säurebildung 260.
 — — von *Rhizopus nigricans* 265.
 Gärungsaktivatoren 14.
 Gärungsschemie Bedeutung industrielle 1.
 — — präparative 6.
 — — wissenschaftliche 6.
 — Entwicklung 17.
 — technische 9.
 Gärungsendprodukte 9.
 Gärungsgleichung 18.
 Gärungsindustrie 1.
 Gärungsorganismen, Anforderung an 12.
 — Aufbewahrung 270.
 — Auffindung 12, 43.
 — Aufzucht 12.
 — Auswahl 12, 53.
 — Bedeutung 5.
 — Gewinnung 12, 43.
 — Identifizierung 54.
 — Vorkommen 44.
 Gärungsschema 9, 83, 142.
 Gärungsvorgänge, Aufklärung 6, 8.
 Gärungszwischenprodukte 8.
 Gärverlauf, Kontrolle 82.
 Gärvermögen, Abnahme 50.
 — Konstanthaltung 12.
 — Schwankungen 53.
 Gärverschluß 72.
 Gärversuche, Ansetzen 79.
 — Aufarbeitung 83.
 — Vorbereitung 270.
 Gefäßmaterial, Einfluß 14.
 Geißelfärbung 56.
 Gelatine 29.
 Gelbes Oxydationsferment 127, 140, 156, 223.
 Gemisch, azeotropes 115.
 Gemmen 72.
 Generationsdauer, Bestimmung 96.
 Generatorverfahren, englisches 220.
 Gentianaviolett 55.
 Geraniol 150.
 Gerste 115.
 Gesamtfärbung 55.
 Getreidemaische 34.
 Getreideschrot 34.
 Gewinnung von Gärungsorganismen 12.
 Gewöhnung von Organismen 12, 51, 215.
 Gewöhnung an Substrate 51.
 Gipsblockkultur 58.
 Glasballon 72.
 Gläserprobe 97.
 Glassinterfilter 42, 91, 103.
 Glassorten 29.
 Gleichgewichtsester 129, 133.
 Gleichteilverfahren 54.
 Glucoheptit 230.
 Glucoheptulose 230.
 Gluconsäuregärung 23, 24.
 — Durchluftungsverfahren 242.
 — Oberflächenverfahren 242.
 Gluconsäure 17.
 — Bildung durch Enzympräparate 238.
 — — — Essigbakterien 230.
 — — — Nektarhefen 268.
 — — — Pilze 237.
 — — in Schüttelkultur 240.
 — Darstellung 230, 237.
 — Oxydationsprodukte der 232.
 — Zwischenprodukt bei der Citronensäuregärung 252.
 — — — Oxalsäuregärung 263.
 Gluconsäurebildung, Bedingungen 241.
 — Enzymchemie 231, 242.
 Glucose, Bestimmung 160.
 — Vergärung 171.
 Glucoseäquivalente, Berechnung 191.
 Glucosemonophosphat 131.
 Glucoseoxydase 238, 242, 244.
 Glucosonsäure 233.
 Glutaminsäure 92, 118.
 Glutathion 170, 172, 222.
 Glycerin 23.
 — Bestimmung 120, 165.
 — Bildung durch *Aspergillaceae* 267.
 — — — *Mucoraceae* 267.
 — Darstellung 121.
 — Destillation 121.
 — Erzeugung 2, 19.
 — Probe auf 122.
 — Verwendung 3.
 Glycerinaldehydphosphorsäure 133, 172, 286.
 Glyceringärung, Technologie 123.
 Glycerinphosphorsäure 131, 183.
 Glycerinsäure 183.
 Glykogen 58, 108.

- Glykogensynthese 143, 286.
 Glykolaldehyd 150, 170, 253.
 Glykolase 170.
 Glykole, Bildung durch Essig-
 bakterien 230.
 Glykolsäure 253, 264.
 — Prüfung auf 262.
 Glyoxylsäure 264.
 — Prüfung auf 262.
 Gramsche Färbung 55, 283.
 Granula 58.
 Granulobacter 66.
 Grünfuttersilierung 4, 163.
 Grünmalz 115.
 Guluronsäure 233.
- H₂-Acceptor** 177.
 Haferhülsen 21.
 Halbdistillation 174, 191.
 Halbierungsverfahren 54.
 Haltbarkeit der Hefe, Bestimmung
 97.
 Häminsystem 223.
 Hansenkölbchen 27.
 Harden-Young-Ester 133.
 Harn, Biosgehalt 92.
 Hartfilter 42.
 Hauptgärung 82, 116.
 Hefe 15, 60, 80.
 — Abtrennung 100.
 — Ausbeute 98, 284.
 — Biosgehalt 92, 284.
 — Einteilung 58, 59.
 — Fortzüchtung 89.
 — Morphologie 58.
 — als Nahrungsmittel 101.
 — obergärige 58.
 — pathogene 57, 59.
 — Physiologie 58.
 — rote 59.
 — schwarze 59.
 — sporenbildende 58.
 — sporenlose 59.
 — untergärige 58.
 — Untersuchung 86, 96.
 — verarmte 80, 107.
 — Verfettung 102.
 — Vorkommen 57.
 — Wirkungen, oxydative 267.
 — Züchtung 88.
 Hefeausbeute, Bestimmung 95.
 Hefeautolysat 34.
 Hefeextrakt, Wuchsstoffnachweis
 91.
 Hefefärbung nach Möller 86.
- Hefegärung 17, 19.
 — Umschaltung 170.
 Hefekochsaft 110.
 Hefenährböden 33, 36, 41.
 Hefepreßsaft 19.
 Heferassen, Verhalten gegen Bios
 93.
 Hefereinzucht 18.
 Hefesaft 34.
 Hefesubstanz, Aufbau 97, 98.
 — Entstehung 99.
 Hefetherapie 101.
 Hefetrockensubstanz, Bestimmung
 91.
 Hefewasser 29, 34, 228.
 Hefezüchtung 88.
 Heißluftsterilisator 37.
 Hemmungskörper 126.
 Henneberg-Nährboden 35.
 Henze-Dämpfer 113.
 Heptylaldehyd 150.
 Heptylalkohol 115.
 Heubacillen 44, 157, 158, 186.
 Hexenol 150.
 Hexosen 16.
 Hexosediphosphat, Darstellung
 128.
 — Reinigung 129.
 Hexosemonophosphat 129.
 Hexylaldehyd 150.
 Hexylalkohol 115.
 Hida-Kolben 74.
 Hilfsmittel, mikroskopische 269.
 Histidin 118.
 Hochdruck-Dampfverfahren 18.
 Hochzüchtung von Organismen 13,
 52, 53.
 Holoferment 126.
 Holzbottich für Gärungen 94.
 Holzkohle 195.
 Holzmehl, Vergärung 213.
 Holzverzuckerung 18, 114.
 Holzzucker 114.
 — Hefegewinnung aus 100.
 Hopfen 18, 115.
 Hormone 92, 127.
 Hoshigaki 23.
 Houle-Kolben 74.
 Humifizierung 65.
 Hydrierungen, biochemische 6.
 — von Aldehyden 148.
 — — Ketonen 150.
 — — Nitrokörpern 153.
 — — ungesättigten Verbindungen
 153.

- Hydrierungen von Säuren 208.
 — durch butylogene Bakterien 201, 208.
 — — Hefen, Mechanismus 156.
 Hydrochinon 152.
 Hydrokinasen 223.
 Hydrozimtalkohol 153.
 Hyphen 67.
 Hypertrophische Zellformen 65.
- Impfkultur 47, 53, 79.
 — Anlegung einer 235.
 Impfraum 274.
 Impfung 269.
 Indoylessigsäure 92.
 Infektion, Fernhaltung von 88.
 Ingwerbier 58.
 Inosit, Oxydation 230.
 Invertase 128.
 Ionenzuchtwahl 45.
 Isobutylalkohol 115, 118.
 Isobutyraldehyd 115, 150.
 Isolierung von Zwischenprodukten 10.
 Isoleucin 118.
 Isomerasen 132.
 Isopropylalkohol 22.
 — Bildung 191, 288.
 — Oxydation 224.
 Isovaleraldehyd 150.
 Itaconsäure, Verwendung 4.
- Jodessigsäure 133, 253.
 Jodformprobe 111.
 Jodprüfung 35.
 Joghurt 20, 158.
- Kahmhefen 59, 88.
 — Vorkommen 44.
 Kaliumgluconat, Herstellung 232.
 Kalomelmethode 180.
 Kammer, feuchte 28, 46.
 Kanadabalsam 56.
 Kartoffel 101.
 Kartoffelbrennerei 18, 101, 114.
 Kartoffelmaische, Vergärung auf Aceton 192.
 Kartoffelnährböden 38.
 Kasein 41.
 Käsureifung 20.
 Katalase 16, 223.
 Kefir 20.
 Keimgehaltsbestimmung 53.
 Keimung der Gerste 115.
 Keimzählung 57.
- Keltern 116.
 Kernhefe 90.
 Kerzen, zur Filtration 42.
 Ketipinsäure 252.
 2-Ketogluconsäure 17.
 — Bildung 232.
 — Identifizierung 233.
 5-Ketogluconsäure 17.
 — Darstellung 232.
 — Nachweis 232.
 Ketaldehyd-Mutase 170 ff., 222.
 — der Essigbakterien 225.
 Ketaldehyd, Hydrierung 152.
 Ketone, Hydrierung 150, 152.
 — ungesättigte, Hydrierung 154.
 Ketosäuren, Decarboxylierung 125.
 — Entstehung aus Zuckercarbon- säuren 6, 232.
 — Hydrierung 150, 154.
 Ketosen, Bildung durch Essig- bakterien 229, 230.
 — Vergärung durch Essigbakterien 226.
- Kettenmilchsäurebakterium 87.
 Kieselalgen 106.
 Kieselgur 42.
 Kinasen 126.
 Klärschichten 31.
 Klärung von Substraten 30.
 Kleingärmethode 108.
 Kloeckera 59.
 Kluyver-Kolben 77, 94.
 Knospen 96.
 Knospung 58.
 Kochkolben 28.
 Kochsalzlösung, physiologische 216.
 Kochscher Dampftopf 37.
 Kochsches Plattenverfahren 46.
 Kodeinreaktion 262.
 Kognak 117.
 Kohlensäure-Tabellen 280.
 Kojisäure 17, 25.
 — Bildung durch Essigbakterien 245.
 — Bestimmung 243.
 — Gewinnung 244.
 — Prüfung auf 243.
 Kojisäuregärung 25.
 — Chemismus 244.
 — Erreger 244.
- Kolonien 53.
 Kolonnenapparate 115.
 Kombucha 58.
 Komplemente 126.
 Kompressor 94.

- Kondensationsprozesse 22, 208.
 Konidien 67.
 Konservierung von Nahrungs-
 mitteln 4, 20.
 Konstanthaltung des Gärver-
 mögens 12.
 Konzentration der Nährlösung 13.
 Köpfeschimmel 72.
 Kornbrennerei 114.
 Kraut, Einsäuern von 4.
 Kreatin 131.
 Kristallviolett 55.
 Kühlraum 274.
 Kugelmühle 104.
 Kugelzellen 72.
 Kultur, Aufbewahrung 50.
 — submerse 237.
 — Vorbereitung 80.
 Kumys 20.
 Kunstfaserzeugung 101.
 Kunsthefefabrikation 18.

 Laboratoriumsessigbildner 218.
 Lactatvergärung 179.
 Lactobacillus 20.
 — acidophil-aerogenes 170.
 — Beijerincki 62, 87.
 — bulgaricus 158, 169.
 — casei 21, 175.
 — caasicum 172.
 — cucumeris 163.
 — Delbrücki 20, 21, 50, 62, 113,
 163, 169, 172.
 — fermentatus 170, 171.
 — fructivorans 170.
 — gracilis 170.
 — helveticum 63, 172.
 — Herstellung von Impfkulturen
 158.
 — Isolierung 157.
 — lycopersici 164, 170.
 — mannitopeus 164, 170.
 — mobile 21.
 — pentoaceticus 21, 170.
 — pentosus 170.
 Lactoflavin 93, 127.
 Lactoflavinphosphorsäure 141.
 Lange-Kolorimeter 96.
 Läuterbottich 116.
 Leuchtgas 84.
 Leucin 92, 118.
 Liebermann-Burchardsche Re-
 aktion 103.
 Lignin, Vergärung 213.

 Lignin-Huminsäuren, Vergärung
 213.
 Lipase 127.
 Lipoidgehalt-Bestimmung 103, 285.
 Lochbildung im Schweizerkäse 21,
 61.
 Löfflersche Methylenblaufärbung
 87.
 Lohnsteinsches Saccharometer 109.
 Luftbad 113.
 Luftheferverfahren 94 ff.
 Lugolsche Lösung 56.
 Lupulin 115.
 Lysin 92.

 Macerationssaft 108, 130.
 Magazin, Einrichtung 274.
 Magnesiumionen, Einfluß 132.
 Maisbrennerei 114.
 Maischbakterien 67.
 Maischprozeß
 Maiskolben, Verwertung 21.
 Maiswürze-Agar 39.
 Malachitgrün 55.
 Maltose, Vergärbarkeit 59, 117.
 Malzessig 220.
 Malzgewinnung 115.
 Malzwürze 33.
 Manganionen, Einfluß von 132.
 Mangelkrankungen 101.
 Mannit 21.
 Mannit, Bestimmung 165.
 — Identifizierung 167.
 — Isolierung 166.
 Mannitgärung der Pilze 25, 166.
 — — Rüben 171.
 Mannit-Essigsäuregärung 21, 165.
 Mannonsäure 231, 242.
 Mannose, Vergärbarkeit 117.
 Mannose-6-Phosphorsäure 131, 133.
 Massenkulturen von Bakterien 159,
 180, 216.
 — — Schimmelpilzen 235.
 Melasse 100.
 — Backhefegewinnung aus 94.
 — Klärung 99.
 — N-Gehalt 95.
 Melassebrennerei 114.
 Melassewürze 33, 94.
 Membranfilter 42.
 Messokular 57.
 Messungen, mikroskopische 57.
 Metallschalen, bei der Gärung 74.
 Metallspuren, Einfluß 14, 93.
 Methan, Verwendung 4, 212, 214.

- Methanbakterien 212.
 — Vorkommen 44.
 Methangärung 23, 65, 212, 214.
 — Chemismus 213, 214.
 Methanol 84.
 Methode der natürlichen Reinzucht 45.
 — nach Zeisel-Fanto-Stritar 120.
 Methyl-Äthyl-Keton 195.
 — Hydrierung 152.
 Methylenblau 55, 222.
 Methylenblau-Atmung 221.
 Methylglyoxalase 16
 (vgl. auch Ketonaldehyd-Mutase).
 Methylglyoxim 167.
 Methyl-Phenyl-Carbinol 151.
 Methyl-Phenyl-Glykol 146.
 Methyltetronsäuren, Bildung von Derivaten 245.
 Methylviolett 55.
 Michaelisverfahren 220.
 Mikrobenfiltration 37.
 Mikrobensuspension 57.
 Mikrodestillationsapparat 189, 190.
 Mikromanipulator 235.
 Mikroorganismen, Sammlungen von 281.
 Mikroskop 54, 269.
 Mikroskopiererraum 274.
 Milch als Substrat 44.
 Milchpräparate 20.
 Milchsäure 16, 20, 21, 23, 88.
 — Abbau 287.
 — als Hemmstoff der Oxalsäurebildung 263.
 — Bestimmung 160, 165, 286.
 — Darstellung 162.
 — Gewinnung 161.
 — Identifizierung 175.
 — optische Aktivität 163, 286.
 — Racemisierung 163, 286.
 — Verwendung 3.
 — Welterzeugung 3.
 — Zn-Salz 168.
 d-Milchsäure, Gewinnung durch Pilze 163, 286.
 Milchsäurealdehyd 7, 150.
 Milchsäure-Äthanolgärung 164, 165.
 Milchsäurebakterien 20, 61, 88, 93, 185.
 — heterofermentative 21, 170.
 — Impfkulturen von 159.
 — Massenkulturen 158.
 — Nährböden 49.
 Milchsäurebakterien, Regenerierung 157.
 — Trockenpräparate 159.
 — Vorkommen 44.
 Milchsäuregärung 3, 20, 157.
 — Faktoren 163.
 — heterofermentative 164, 170.
 — homofermentative 169.
 — — Erreger 169.
 — Technologie 162.
 — Umschaltung anderer Gärungen in 170.
 Milchsäure-Essigsäuregärung 21.
 Milchserum-Kreide-Agar 38.
 Milchsücker, Vergärbarkeit 59.
 Milieuänderungen, Einfluß 10.
 Mineralsalzlösungen 52.
 Mischkulturen 13.
 — bei Buttersäuregärung 197.
 — — Hefegärung 13.
 — — Propionsäuregärung 175.
 Modellzuchtungsversuche 98.
 Modifikation von Bakterien 50.
 Molekulargewichte 277 ff.
 Molke 101.
 — Butylgärung der 195.
 Molke-Pepton-Agar 38.
 Montanin 42.
 Most 116.
 Mucoraceengärung 266.
 Mucorarten 72, 93, 114.
 — Vorkommen 44.
 Mucor javanicus 267.
 — mucedo 71.
 — piriformis 248.
 — racemosus 71.
 — stolonifer 24.
 Mutase 222.
 Mutation 50, 52.
 Mycel 67.
 — submerses 81, 236.
 — technische Erzeugung 237.
 — verarmtes 236.
 Mycoderma 59, 87.
 — aceti 23.
 — cerevisiae 60.
 — variabile 60.
 Mycodermen, Unterdrückung 214.
 Nachgärung 82, 116.
 Nähragar 39.
 Nährboden nach Bernhauer-Görlich 40.
 — — Bredemann 40.
 — Czapek-Dox 41.

Nährboden, Hayduck 41.
 — Henneberg 35, 40, 41.
 — Knop 40.
 — Meyer 40.
 — Uschinsky 40.
 — Woeltje 41.
 Nährböden, Aufbewahrung 270, 289.
 — für Bakterien 34, 35, 38, 39, 40, 49.
 — — Hefen 33, 36, 41, 49.
 — — Schimmelpilze 33, 36, 41, 49.
 Nährbodenküche 270.
 Nährgelatine 39.
 Nährlösung, Abfüllen 31, 271.
 — Bereitung 30.
 Nährsalze 13.
 Nährsubstrate, natürliche 29.
 — künstliche 29, 32.
 — Zusammensetzung 28.
 Nahrungsmittel, Hefe als 101.
 Nahrungsmittelerzeugung 4.
 Naphtholgrün 103.
 Natriumfluorid 139, 141.
 N-Bedarf, Berechnung 95.
 N-Gehalt, Bestimmung 96.
 Nektarhefen 268.
 Nephelometrische Bestimmung, der Hefemenge 92.
 Neubergester 133.
 Nickeldimethylglyoxim 147.
 Nicotinsäureamid 93.
 Nitroaldehyde, Reduktion 150.
 Nitrobenzoesäure-Äthylester 112.
 Nitrobenzol, Reduktion 154.
 Nitroglycerin 123.
 Nomenklatur 59.
 N-Quellen 13.
 N-Stoffwechsel 93.
 Oberflächengärung 74.
 Oberflächenkultur 81.
 Oberflächen-Volumen, Verhältnis 76.
 Objektmikrometer 57, 269.
 Objektträger, Reinigung 56.
 Obstbrennerei 117.
 Octadienol 7, 150, 154.
 Octatrienol 7, 150, 154.
 Octatrienol 150.
 Oidien 88.
 — Vorkommen 44.
 Oidium lactis 5, 19, 104, 106.
 Okularmikrometer 57, 269.
 Opekta 29.
 Orcinprobe 232.

Organismen, Fortzüchtung 47.
 Organismenmaterial 80.
 Organismenkatalog 281.
 Orleans-Verfahren 219.
 Osmiumsäure 103.
 Ostsehe Lösung 121.
 Oxalsäuregärung 17, 25, 261 ff.
 — Bedingungen 261, 262.
 — Chemismus 263.
 — Erreger 261.
 Oxalessigsäure 252, 263.
 Oxanthin 7, 23.
 Oxyaldehyde, Reduktion 150.
 Oxyanthrachinone, Bildung durch Pilze 245.
 Oxydationen mit Essigbakterien 7.
 Oxydo-Redukase 135, 140.
 Oxydo-Reduktion 223.
 — Fermentsystem 140, 142.
 — Kupplung mit der Phosphorylierung 141.
 Oxydo-Reduktionsbilanz 9.
 Oxyhämoglobin, Reduktion 150.
 Oxyterephthalsäure, Bildung durch Pilze 245.
 Palmwein 116.
 Pansen 65.
 Parallelkulturen 49.
 Passagen 215.
 Pasteurisierung 187.
 Pasteurkolben 28, 89.
 Pasteurverfahren 221.
 Pastorianus-Hefe 59.
 Pediokokken 44.
 Pektin 29.
 Peligot-Rohr 119.
 Penicillien 24, 88.
 — Vorkommen 44.
 Penicillium glabrum 70.
 — glaucum 25, 70.
 — javanicum 106.
 — luteum 70.
 — luteum-purpurogenum 242.
 — oxalicum 261.
 Pentabromaceton-Methode 250.
 Pentosen, Vergärung durch Bakt. Coli 182.
 — — — Butylbakterien 201.
 — — — Mischsäurebakterien 170.
 — — zu Essigsäure 21.
 Pepton 29.
 Perithetien 67.
 Perseit 230.
 Perseulose 230.

- Petrischalen 26, 46, 102.
 Phenolcarbonsäuren, Bildung
 durch Pilze 245.
 Phenylacetaldehyd 150.
 Phenyl-Acetyl-Carbinol, Darstel-
 lung 144, 145.
 — Derivate 144, 145.
 Phenyläthylalkohol 150.
 Phloroglucinprobe 232.
 Phosphatase 131, 225.
 Phosphatbestimmung 287.
 Phosphobrenztraubensäure 131, 141.
 Phosphoglycerinmutase 141, 142.
 Phosphoglycerinsäure 16, 287.
 — Bildung 139, 177.
 — Darstellung 138.
 — Umwandlung 169, 183.
 — Zerfall 141.
 Phosphohexomutase 132, 142.
 Phosphorylase 131, 141, 142.
 Phosphorylierung 16, 131.
 Phosphotriomutase 132.
 pH-Wert 30, 82.
 Phycomyces 93.
 Phytohormone 92.
 Phytovitamine 92.
 Pilze, Isolierung 234.
 — holzzerstörende 25.
 Pilzdecken, fertige 81.
 Pinzette nach Cornet 56.
 Piperazin 115.
 Piperidinlösung 119.
 Pipette, automatische 91.
 Plattenmikroskop 46.
 Plattenverfahren 45, 46, 53.
 Polyenaldehyde 105.
 Präparate, mikroskopische 54.
 Präzisionsaccharometer nach
 Lohnstein 109.
 Pre.ss-Kolben 74.
 Preßhefe, Gewinnung 94.
 — Infektionen 87.
 — Untersuchung 87.
 — Verwendung 5.
 — Zusammensetzung 98.
 Probe nach Mendel-Neuberg 122.
 — — Schwarz (Chloralhydrat) 149.
 Probeentnahme 82.
 Proberöhren 26.
 Propandiol 123.
 Propionaldehyd 178.
 Propionibacterium sp. 61, 64.
 Propionsäurebakterien 21, 61, 159.
 — Isolierung 173.
 — Massenkulturen 159.
 Propionsäurebakterien, Nährböden
 49.
 — Regenerierung 173.
 — Vorkommen 44.
 Propionsäuregärung 17, 21, 173 ff.
 — Chemismus 177.
 — Zwischenprodukte 178.
 Propylalkohol, Oxydation 223.
 Protolgärung 19.
 Protokollführung 280 ff.
 Provitamin D 101.
 Pseudosaccharomyces 59.
 Pukallfilter 42.
 Pyridin 115.
 Pyridin-Flavin-Katalyse 223, 230.
 Pyrogallol-Kalilauge 49.
 Pyrogallolreaktion 262.
 Pyruvinatgärung 179.
Qualitätssessig 219.
Quetschwasser 219.
Radikalkettentheorie 9.
Raffination 115.
Raffinose, Vergärung 58.
Rahmsäuerung 20.
Rasse XII 114.
Raumeinteilung im Laboratorium
 274.
Reaktionsketten 8.
Redoxpotential 48.
Reduktionen (vgl. auch Hydrie-
 rungen) durch Hefe 7.
**Reduktionsprozesse bei der Butyl-
 gärung** 208.
Regenerierungsgärung 123.
**Regenerierung butylogener Bak-
 terien** 187.
 — der Säurebildung 248.
Reihenversuche, Vorbereitung 271.
Reinheitsprüfung 97.
Reinigungsgärung 45, 88.
Reinzuchtapparat 90.
Reinzucht, absolute 45, 88.
 — natürliche 88, 113.
Reinzüchtungsmethoden 45.
Reisbrennerei 114.
Reiskleie 142.
Reisnährböden 36.
Rektifikation 115.
Reservefett 105.
Respirationsapparat 83.
Rest-C-Bestimmung 83.
Resynthese von Glykogen 254.
 — — Kohlenhydraten 253.
Rhizoiden 72.

- Rhizopin 92.
 Rhizopusarten, Vorkommen 44.
 Rhizopus nigricans 71, 254.
 — sinuatus 92.
 Rieselturm 76.
 Rieselwiesen 65.
 Riesenkolonien 58.
 Riesenzellen 65.
 Rimini-Reaktion auf Aldehyd 118.
 Rolison-Ester 133, 172.
 Roggensuppe 34.
 Rohstoffe der alkoholischen Gärung 113.
 Roux-Kolben 26, 94.
 Rübenbrennerei 114.
 Ruheverfahren 226.
 Rum 117.
- Saccharomyces-Arten 58.
 Saccharomyces-Einheit 91.
 Saccharomyces cerevisiae 59, 60.
 — ellipsoideus 59, 60, 88.
 — Hansen 268.
 — Ludwigii 52.
 Säuren, flüchtige, Bestimmung 165, 211.
 Säuregrad 99.
 Säurehydrazide 124.
 Saké 116.
 Salicylaldehyd 150.
 Saligenin 150.
 Salmonella 182.
 Salzwirkung 123.
 Sammlungen von Mikroorganismen 281.
 Sauerfutter 44.
 Sauerkraut 4, 20, 44.
 Sauerstoff, Entfernen von 48, 49.
 Sauerteig 4, 20, 44.
 Schachtelprobe 97.
 Schichthöhe, Einfluß 76, 249.
 Schimmelpilze 15, 67, 80.
 — Isolierung 234.
 — Massenkultur 235.
 — Nährböden 33, 36, 41.
 — Trockenpräparate 235, 236.
 Schlamm, belebter 65.
 Schleimessigbakterien 67.
 Schlempe 19.
 Schnellmessigbakterien 67.
 — Isolierung 215.
 — Trennung von Bieressigbakterien 215.
 Schnellmessigverfahren 23, 76, 218, 220.
- Scholler-Tornesch-Verfahren 18, 100, 114.
 Schrägagar 31.
 Schüttelkultur 48, 81.
 Schüttelmycel 78, 81.
 Schwefeldioxyd als Desinfektionsmittel 42.
 Schwermetallspuren 29.
 Schweizer Käse 21.
 Sclerotinia 25.
 Seitz-Filter 31, 42.
 Sexualhormone, Reduktion 153.
 Sharples-Strufruge 81.
 Silierung 4, 163.
 Silo 4.
 Silofutter, Bewertung 164.
 Sionon 24, 226.
 Skarscher Apparat 57.
 Sklerotien 70.
 Sojabohne 101.
 Sorbinaldehyd 150, 154.
 Sorbinalkohol 150, 154.
 Sorbinylidenztraubensäure 150
 Sorbosebakterium 23.
 Sorboseerzeugung 23, 227.
 Sorbose-1-Phosphorsäure 134.
 Sorburonsäure 233.
 Speckigwerden des Düngers 65.
 Spiritus (siehe Alkohol und Äthanol).
 Sporangienträger 72.
 Sporenbildung bei Bakterien 59.
 — — Hefe 58.
 — — Pilzen 67.
 Sporenfärbung 56.
 Sporensuspension 235.
 Sprit, Welterzeugung 2.
 Spritessig 219.
 Sproßpilze 58.
 Sprossung 86, 96.
 Stammlösungen 30, 271.
 Staphylococcus aureus 93.
 Stärke Hydrolyse 257.
 — Verkleisterung 113.
 — Verzuckerung 113, 114, 116, 161, 162, 257.
 Stehrundkolben 72.
 Steinerkammer 57, 269.
 Stellhefe 94, 100.
 Sterigmen 67.
 Sterilinkubator 74, 236.
 Sterilisation 32.
 — chemische 42.
 — durch Hitze 37.
 — — Wasserdampf 37.

- Sterilisationskammer 274.
 Sterilisationszeit 37.
 Sterilisatoren 271, 272.
 Sterinbestimmung 103.
 Stiehkulturen 31, 48, 187.
 Stoffwechsel 15.
 Stoffwechselbilanz 9.
 Stolonen 72.
 Streptokokken 158.
 Streptococcus lactis 63.
 — thermophilus 158.
 Strichkultur 49, 87.
 Strömungsmesser 94.
 Sublimat 42, 81.
 Substratbeschaffenheit 13.
 Substratgewöhnung 51.
 Substratkonzentration 13.
 Substratspezifität 126, 132, 141.
 Substratwechsel 13, 52, 283.
 Sulfitgärung von *Aspergillus niger* 265.
 Sulfitlauge 18, 100, 114.
 Sulfatlauge, Butylgärung 195.
 Superzentrifuge 81.
 Takadiastase 237.
 Teestaub, Gehalt an meso-Inosit 92.
 Tetrise, Oxydation 230.
 Thermobacterium (siehe unter *Lactobacillus*).
 Thermobakterien, cellulosever-gärende 209.
 Thermostaten 82, 90, 272.
 Thialdin 150.
 Thioaldehyde, Reduktion 150.
 Thoma-Zeiss-Kammer 57.
 Tierkohle, Wuchsstoffgehalt 92.
 Titrationseinrichtungen 273.
 Toluol 43, 117.
 Tolylaldehyd 146.
 Tomatensaft, Wuchsstoffgehalt 92.
 Topinambur 171.
 Torf, Alkoholerzeugung aus 115.
 Torula 59, 88.
 — lactis 101.
 — pulcherrima 105.
 — utilis 19, 60, 100.
 Träger 126, 161.
 Traubenwein 116.
 Treber 116.
 Trehalose 117.
 Tribomäthanol 150.
 Trichloräthanol 149.
 — Identifizierung 149.
 Triebkraft 87.
 — Bestimmung 97, 109.
 Trimethylenglykoll 123.
 Triosephosphorsäure 16, 133, 172.
 Trockenhefe 5, 100, 107, 285.
 Trockenpräparate 55.
 — von Bakterien 159.
 — — Schimmelpilzen 236.
 Trockensubstanz 98.
 — Bestimmung 91, 107.
 Tropfen, hängender 54.
 Tröpfchenkultur 46, 87, 89.
 Trub 19.
 Tryptophan 118.
 Tryptophol 118.
 Tuschepunktverfahren 45, 47.
 Tyrosin 118.
 Tyrosol 118.
 Ultrafilter 42.
 Umschaltung von Gärungen 10.
 Umwandlungsphasen 9.
 Unterteilungsverfahren 54.
 Vakuolen 58, 86.
 Vakuum, Kultivierung 48.
 Vakuumdestillation 84.
 Vakuumverdampfungsanlage 273.
 Valeraldehyd, Reduktion 148.
 Valeraldehydammoniak 149.
 Valeriansäure 197.
 Valin 118.
 Varianten 52.
 Variation 50.
 Veratmung von Sauerstoff 49.
 Verdauungsfermente 101.
 Verdünnungsverfahren 45, 186.
 Verfahren, submerses 24.
 Verfettung 52.
 — von Hefe 102.
 Vergärungsform, Chemismus 123.
 — erste 108.
 — zweite 118.
 — dritte 127.
 — vierte 136.
 — fünfte 134.
 Vermehrungsfähigkeit 98.
 Verwertung landwirtschaftlicher Produkte 2.
 Vibrio 56.
 Vierkantfläschchen 26.
 Vitalfärbung 55, 56.
 Vitamine 127.
 Vitamin-B 93, 101.
 — Gehalt der Hefe 285.

- Vitamin C 24.
 Vitaminreichtum 101.
 Vorkommen von Gärungserregern 44.
 Vorzüchtung 81.

 Wachstumsstimulatoren 29, 93.
 Warburgsches Coferment 140.
 Waschung von Gasen 48.
 — physiologische 30.
 Wasser, Bedeutung für die Gärung 14.
 Wasserdampfdestillation 211.
 Wasserstoff 21, 48.
 Wasserstoffacceptoren 177, 222.
 Wasserstoffdonatoren 177, 223.
 Wasserstoffionkonzentration 13, 30, 138.
 Wasserstoffsuperoxyd 223.
 Wasserstofftransport 223.
 Watteverschlüsse 31.
 Wechsel, des Substrates 12.
 Wechselüberimpfungen 187.
 Weichfilter 42.
 Wein, Alkoholgehalt 117.
 — Geschichte 18.
 — Gewinnung 116.
 — Reifen 116.
 — Weiterzeugung 2.
 Weinbrennerei 117.
 Weinessigbakterien 67.
 — Isolierung 214.
 Weinhefen, Untersuchung 88.
 — Vorkommen 44.
 Weinsäure 25.
 Weißbier 20, 116.
 Weltmarkteiweiß 5.
 Whisky 117.
 Widmer-Kolonie 112.
 Wilandsche Theorie 222.
 Wirkgruppe 126.
 Wirkstoffe 14.
 Wirkungsspezifität 126.
 Woulffsche Flasche 72, 94.
 Wuchshefen 100.
 Wachstumsstoffe 29.
 — Trennung von Z-Faktor 144.
 Wachstoffsbedarf, Bestimmung 91.
 Wachstoffsgehalt, Nachweis 91.
 Würzeagar 36.
 Würzebakterien 67.
 Würzebereitung 116.
 Würzegeleatine 36.
 Würze-Kreide-Agar 36.
 Würze, Vergärung 116.

 Xyloketose 230.
 Xylonsäure 231.

 Zählkammern 57, 87.
 Zählplatten 53.
 Zählungen 57.
 Zeichenapparat 269.
 Zellformen, hypertrophische 65.
 Zellgeschehen, Chemismus 6.
 Zellgifte 10.
 Zellstoffproduktion 100.
 Zellvergrößerung 52.
 Zentrifugen 273.
 Zephirol 42.
 Z-Faktor 14, 143.
 Zimtaldehyd 150.
 Zimtalkohol 150, 154.
 Zink 93.
 Züchtung von Hefe 88.
 Züchtungskammern 210.
 Züchtungsprotokolle 282.
 Zuckerabbau 15, 16, 141.
 Zuckeralkohole, Oxydation 229.
 Zuckerbestimmung nach Bert-
 rand 160.
 — — Lehmann-Maquetten-
 Schoorl 164.
 Zuckerkonzentration, Einfluß 98.
 Zuckerkurven 275, 276.
 Zuckersäure, Bildung durch Nek-
 tarhefen 268.
 Zucker, Oxydation 17, 229.
 — vergärbare 117.
 Zulaufverfahren 94, 98.
 Zusammensetzung des Substrates 13.
 Zusätze 82.
 Zwischenprodukte 8.
 — bei der Butylgärung 200, 202,
 203, 207.
 — — — Citronensäuregärung
 250.
 — — — Coligärung 183.
 — — — Essiggärung 220.
 — — — Fumarsäuregärung 259.
 — — — Oxalsäuregärung 262.
 — — — Propionsäuregärung 178.
 — Festlegung 10.
 — Umwandlung 11.
 Zymase 19, 142.
 — der Essigbakterien 225.
 — — Schimmelpilze 267.
 Zymoin 107.
 Zymohexasesystem 132, 135, 142.
 Zymohexosen 117.

II. Spezielles

(Bildung, Umwandlung, Nachweis)

Gärprodukte und Substrate	Bildung	
	durch (Organismen usw.)	aus (Substrate usw.)
Acetaldehyd	Hefe 10, 17, 118, 142 Essigbakterien 10, 220 Butylogene Bakt. 198, 202, 207 Colibakterien 184 Schimmelpilze 265, 266, 267 Carboxylase 124	bei der zweiten Vergärungsform 10, 118, 123, 184, 185, 198, 202, 207, 265 Brenztraubensäure 16, 124, 142, 184 Alkohol 220 Zucker 118, 123, 265 Methylglyoxal 184 Äthylenglykol 184
Acetaldol	—	—
Acetessigsäure	butylogene Bakterien 205	Essigsäure 17, 206
Acetoin (Methylacetylcarbinol)	Hefe 146, 155 Aerogenesbakt. 184, 185 Aerobacillen 208 butylogene Bakt. 201 Essigbakterien 230	Acetaldehyd 146, 147 Brenztraubensäure 155, 201 Kohlehydraten 170 2,3-Butylenglykol 230
Acetol	Essigbakterien 230	Propylenglykol 230
Aceton	butylogene Bakt. 66, 190, 204, 205 Aerobacillen 208 Essigbakt. 225	Kohlehydraten 188, 208 Essigsäure 17, 205 Acetessigsäure 17, 205 Isopropanol 225
Äpfelsäure	Rh. nigricans 256 Fusarien 256; Pflanzen 253	Glucose 256
Äthanol	Hefe 108, 109, 113 ff. Butylbakt. 66, 189 Cellulosevergärer 23, 212 heterofermentative Milchsäurebakt. 164 Colibakt. 180, 183 Thermobact. mobile 21 Essigbakt. 221, 225 Rh. nigricans 265 Schimmelpilze 10, 266	Cellulose 23, 212 Sulfitablaue 114 Torf 115 Zuckerarten 117, 164, 225, 265 Acetaldehyd 11, 17, 183, 184, 221

Sachverzeichnis.

und Bestimmung der wichtigsten Gärprodukte.)

Umwandlung		Isolierung, Nachweis und Identifizierung	Quantitative Bestimmung
durch (Organismen usw.)	in (Umwandlungs- produkte)		
Hefe 138, 142, 146 butylogene Bakt. 11, 207 Essigbakterien 221	Äthanol 11, 17, 184, 202, 207, 220 Essigsäure 17, 184, 221 Acetoin 146, 201 Aceton 207	Nitroprussidnatri- umreaktion 118 mittels Dimethon 124 als 2,4-Dinitrophe- nylhydrazon 169	maßanalytisch 119
Hefe 150 butylogene Bakt. 207	1,3-Butylenglykol 7, 150 Aceton 207	—	—
butylogene Bakt. 206, 207	Aceton 11, 17, 206, 207	—	neben Aceton 206
Hefe 152 Aerobacillen 208	2,3-Butylenglykol 152, 184, 208	als p-Nitrophenyl- osazon 146	als Nickeldimethyl- glyoxim 147
Hefe 152	Propylenglykol 152	—	—
Butylbakterien 203	Isopropanol 203	p-Nitrophenylhydr- azon 194 Dibenzalaceton 194	Umwandlung in Jodoform 190 neben Acetoin 190 neben Acetessig- säure 206
—	—	—	Überführung in Fumarsäure 256
Essigbakt. 217 ff, 220 Rh. nigricans 259 Hefe 99, 267, 268 Aspergillus 267 Schimmelpilze 266	Essigsäure 3, 23, 217 Acetaldehyd 220 Bernsteinsäure 268 Fumarsäure 259 Oxalsäure 268 Citronensäure 268 Fett 102, 105 Zellsubstanz 99	p-Nitrobenzoe- säurester 112 Jodoformprobe 111 Oxydation zu Acet- aldehyd 112	Zeisel-Fanto 112, 180 Oxydation zu Essig- säure 112, 180 pyknometrisch 112 neben Acetaldehyd 121 neben Butanol 189 neben Essigsäure 218

Gärprodukte und Substrate	Bildung	
	durch (Organismen usw.)	aus (Substrate usw.)
Äthylenglykol	—	—
Ameisensäure	Colibakterien 180, 182 Butylbakterien 200, 201 Aerobacter 208 Cellulosevergärer 23, 213 Schimmelpilze 264	Kohlehydrate 180, 208 Brenztraubensäure 182, 200, 201 Glycerinph. 182 Cellulose 23, 213 Fumarsäure 264
Bernsteinsäure	Colibakterien 17, 182 Aerobacillen 208 Propionsäurebakterien 17, 176, 179 Rh. nigricans 254, 258 Hefe 268; Fusarien 266	Essigsäure 11, 180, 260 Glucose 176, 182, 254 Glycerin 180 Glutaminsäure 118 Alkohol 259
Brenztraubensäure	Hefe 10, 136 ff, 263 Milchsäurebakt. 169, 172 Propionsäurebakterien 178 Colibakterien 183 Schimmelpilze 265 Butylbakt. 200, 202, 204	Zuckerarten 10, 136, 183, 200 ft Hexosediphosphat 136 Phosphoglycerinsäure 169, 182 Abfangung 172, 178, 265
Butanol	Butylbakt. 66, 188, 198, 203 Hefe 115, 150, 152	Kohlehydrate 188 Buttersäure 198, 203 Crotonaldehyd 150, 154 Crotylalkohol 154 im Fuselöl 115
Buttersäure	Butylbakt. 66, 188, 198, 207 Cellulosevergärer 22, 212 Hefe 115	Getreidemaische 188, 198 Acetessigsäure 203 Brenztraubensäurealdol 200 Cellulose 22, 212 im Fuselöl 115
1,3-Butylenglykol	Hefe 7, 150, 152	Acetaldol 7, 150 Acetessigaldehyd 152
2,3-Butylenglykol	Hefe 7, 152 Aerobacillen 21, 181, 184 Aerogenesgruppe 21, 181	Acetoin 152, 181, 184, 208 Glucose 181 Diacetyl 7, 152

Umwandlung		Isolierung, Nachweis und Identifizierung	Quantitative Bestimmung
durch (Organismen usw.)	in (Umwandlungs- produkte)		
Colibakt. 184	Acetaldehyd 184	—	—
Colibakt. 184 Bakterien 182, 183 Aspergillusarten 264	CO ₂ und H ₂ 182, 183 Oxalsäure 264	—	neben Essigsäure 180 Kalomelmethode 180
Propionsäurebakt. 178	Propionsäure 178	Extraktion 175	Ag-Salz 256
Hefe 124 heterofermentative Milchsäurebakt. 177 Colibakt. 183 Butylbakt. 200, 202, 204 Carboxylase 124	Acetaldehyd 11, 16, 124, 142, 183 Milchsäure 171, 172 182, 183 Essigsäure 170, 177, 178, 182, 183, 200, 202 Propionsäure 177, 178 Ameisensäure 182, 183, 200, 202 Butylprodukte 202 Acetoin 202 Aceton 202	2,3-Dinitrophenyl- hydrazon 136, 169	Cerisulfat 137
—	—	Destillation 193	neben Äthanol 189
Butylbakt. 198, 207	Butanol 198, 201 Aceton 207	Ag-Salz 196 Ca-Salz 197	neben Essigsäure 191
—	—	—	—
Essigbakt. 230	Acetoin 230	—	Nickeldymethyl- glyoxim 182

Gärprodukte und Substrate	Bildung	
	durch (Organismen usw.)	aus (Substrate usw.)
Butyraldehyd	—	—
Citronensäure	Aspergillusarten 245 ff. M. piriformis 248 Fusarien 266; Hefe 268	Rohrzucker 245 Ca-Acetat 250 Ba-Acetat 268
Crotonsäure	—	—
Diacetyl	—	—
Dioxyaceton	Essigbakt. 7, 23, 228, 289	Glycerin 7, 23, 228, 289
Dioxyacetonphosphorsäure	Hefemacerationssaft 132 Zymohehexase 132	Hexosediph. 132, 139 Abfangung 132
Essigsäure	Hefe 127, 128, 268 heterofermentative Milchsäurebakt. 21, 164 homofermentative Milchsäurebakt. 163, 170 Propionsäurebakt. 22, 173, 176 Colibakt. 180, 182 Butylbakt. 189 ff., 198, 201 Aerobacillen 204 Cellulosebakt. 23, 211 ff. Essigbakt. 217, 220, 226 Schimmelpilze 259, 266, 267	Acetaldehyd 17, 183, 184, 220ff. Pentosen 21, 170 Hexosen 21, 164, 170, 183, 199, 226 Cellulose 23, 211, 213 Getreidemaische 188, 192 Milchsäure 173, 176 Brenztraubensäure 176 Äthanol 3, 23, 259, 268 im Fuselöl 115 bei der 3. Vergärungsform 127, 128
Fructose ¹	Essigbakt. 230	Mannit 230
Fumarsäure	Rh. nigricans 24, 254 ff. Asp. fumaricus 258	Bernsteinsäure 11, 260 Glucose 255 Alkohol 259 Ca-Acetat 260
Galaktonsäure	Essigbakt. 7, 231	Galaktose 7, 231

¹ In diesem Fall sind nur einfache Umwandlungsvorgänge angeführt.

Umwandlung		Isolierung, Nachweis und Identifizierung	Quantitative Bestimmung
durch (Organismen usw.)	in (Umwandlungs- produkte)		
Butylbakt. 203, 207	Butanol 203 Aceton 203, 207	—	—
—	—	Ca-Salz 246	als Ca-Salz 246 als Pentabrom- aceton 250
Butylbakt. 203, 207	Butanol 203, 207 Aceton 203, 207	—	—
Hefe 7, 152	Butylenglykol 7, 152	—	—
Hefe 152	Glycerin 152	Krystallisation 229	Fehling-Reduktion 229
Hefemacerations- saft 132	Glycerinaldehydph. 139 Phosphoglycerin- säure 139 Glycerinphosphor- säure 139	—	—
Butylbakt. 205, 207 Asp. niger 250 Rh. nigricans 260 Hefe 268	Aceton 205, 207 Bernsteinsäure 11, 260, 268 Fumarsäure 260, 268 Citronensäure 250 Oxalsäure 250, 262 Acetessigsäure 208 Äthanol 208	Ag-Salz 176, 192, 196 p-Bromphenacyl- ester 174	neben Propion- säure 173, 174 neben Buttersäure 191 neben Äthanol 218
heterofermentative Milchsäurebakt. 21, 165 Essigbakt. 245	Mannit 21, 165 Kojisäure 245	—	—
Rh. nigricans 260 Aspergillus 264	Äpfelsäure 260 Ameisensäure 264 Glyoxylsäure 264	Ca-Salz 254, 255, 258	Mercurosalz 255
—	—	—	—

Gärprodukte und Substrate	Bildung	
	durch (Organismen usw.)	aus (Substrate usw.)
Galaktose	Essigbakt. 229	Dulcit 229
Gluconsäure	Essigbakt. 23, 230 Schimmelpilze 24, 237 ff.	Glucose 7, 17, 23, 24, 230, 237
Glyoxylsäure	Schimmelpilze 264	Fumarsäure 264
Glycerin	Hefe 118 ff, 123, 127, 136, 152 heterofermentative Milch- säurebakt. 164	bei der 2. Vergärungsform 118, 123 bei der 3. Vergärungsform 127 bei der 4. Vergärungsform 136 Hexosephosphat 136, 138 Dioxyaceton 152 Glucose 164
Glycerinphosphor- säure	Hefe 139, 142 Milchsäurebakt. 172 Colibakt. 182	Triosephosphorsäure 139, 142, 172, 182
Glycerinsäure	—	—
Hexosediphosphat	Hefe 128 ff. Milchsäurebakt. 172 Colibakt. 182	Glucose 182 Rohrzucker 128
Isopropanol	Butylbakt. 191, 203, 208	Getreidemaische 191 ff. Arabinose 203 Aceton 203
2-Ketogluconsäure	Essigbakt. 232	Gluconsäure 7, 17, 232
5-Ketogluconsäure	Essigbakt. 232	Gluconsäure 7, 17, 232

Umwandlung		Isolierung, Nachweis und Identifizierung	Quantitative Bestimmung
durch (Organismen usw.)	in (Umwandlungs- produkte)		
Essigbakt. 231 Hefe 117	Galaktonsäure 231 Vergärbarkeit 117	—	—
Essigbakt. 7, 17, 232 ff.	2-Ketogluconsäure 7, 17, 232, 233 5-Ketogluconsäure 7, 17, 232	Ca-Salz 231, 238	aus dem Ca-Gehalt 231, 238
Schimmelpilze 264	Ameisensäure 264 Oxalsäure 264	—	—
Essigbakt. 7, 23, 228 ff. Bakterien 123 Propionsäurebakt. 178, 179 Colibakt. 183	Dioxyaceton 228 ff. 1,2-Propandiol 123 1,3-Propandiol 123 Propionsäure 178, 179 Propionaldehyd 178 Alkohol 183 Ameisensäure 183	Oxydation zu Triose und Or- cinreaktion 122 durch Destillation 121	als Isopropyljodid 120 nach Wagenaar 165
Milchsäurebakt. 172 Colibakt. 182, 183	Triosephosphor- säure 172 Alkohol 182, 183 Ameisensäure 182, 183	—	—
Colibakt. 183	Essigsäure 183 Ameisensäure 183	—	—
Hefe 134, 135, 138 Milchsäurebakt. 167 Colibakt. 182, 183 Essigbakt. 225 Schimmelpilze 266 Propionsäurebakt. 178 Butylbakt. 202	Phosphoglycerin- säure 138 Dioxyacetonph. 142, 182 Methylglyoxal 134, 167, 178, 183, 202, 225, 266 Brenztraubensäure 136	—	—
Essigbakt. 224	Aceton 224	—	neben Aceton 191
—	—	K-Salz 233 Chinoxalinderivat 233	—
—	—	Ca-Salz 232 Farbreaktionen 232	—

Gärprodukte und Substrate	Bildung	
	durch (Organismen usw.)	aus (Substrate usw.)
Kojisäure	Schimmelpilze 243 Essigbakt. 245	Glucose 243 Fructose 245 Mannit 245
Mannit	heterofermentative Milch- säurebakt. 165 Schimmelpilze 25	Fructose 165 Zucker 25
Mannonsäure	Essigbakt. 231 Schimmelpilze 242	Mannose 231, 242
Mannose	Essigbakt. 229	Mannit 229
Methylglyoxal	Hefe 134 Milchsäurebakt. 167, 171 Propionsäurebakt. 178 Colibakt. 183 Butylbakt. 199, 202 Essigbakt. 225 Schimmelpilze 226	bei der 5. Vergärungsform 134 Triosephosphorsäure 16 Hexosediphosphat 134, 167, 172, 178, 183, 202, 225, 266
Milchsäure	Milchsäurebakt. 159 ff, 164, 170, 172 Butylbakt. 170, 200, 202 Cellulosevergärer 23, 212 Colibakt. 170, 181 Hefe 170 Aerobacillen 208 Propionsäurebakt. 173, 178	Pentosen 21, 170 Hexosen 159, 164, 171, 172, 173 Cellulose 23, 212 Hexosediphosphat 170 Brenztraubensäure 182 Milchsäurealdehyd 178 Methylglyoxal 17, 168, 170, 172, 178
Oxalsäure	Asp. niger 25, 261, 262, Pen. glaucum 25 Coniophora cerebella 25	Zucker 261 Na-Acetat 262 Ca-Formiat 263 Holz 25 andere Stoffe 263, 264
Phosphoglycerin- säure	Hefe 138 Milchsäurebakt. 172 Colibakt. 182, 183	in Gegenwart von NaF 10,138 Triosephosphorsäure 16, 138, 172, 182 Hexosediphosphorsäure 138,
Propanol	Butylbakt. 208	Propionsäure 208 im Fuselöl 115

Umwandlung		Isolierung, Nachweis und Identifizierung	Quantitative Bestimmung
durch (Organismen usw.)	in (Umwandlungs- produkte)		
—	—	Eisenchloridreak- tion 243 Krystallisation 244	als Cu-Salz 243
Essigbakt. 229, 245	Mannose 229 Fructose 229 Kojisäure 245	Isolierung 166 Tribenzalverb. 167	nach Smit 165
—	—	—	—
Essigbakt. 231 Schimmelpilze 242	Mannonsäure 231, 242	—	—
Hefe 152, 170 Milchsäurebakt. 168 172 Colibakt. 184 Propionsäurebakt. 178	Milchsäure 16, 168, 170, 172, 178, 183 nach dem Brenz- traubensäure- schema 16, 184 nach dem Ameisen- säureschema 16, 184 Propylenglykol 152	als 2,4-Dinitrophe- nylosazon 134 als Dioxym 134, 167	als 2,4-Dinitrophe- nylosazon 135
Propionsäurebakt. 176, 178, 179	Propionsäure 176, 178, 179 Essigsäure 176, 178, 179	Ca-Salz 161 Zn-Salz 168 Extraktion 175 Oxydation 160	Oxydation zu Acet- aldehyd 160
—	—	Pb-Salz 261 Krystallisation 261	Ca-Salz 261
Hefe 142 Milchsäurebakt. 169 172 Colibakt. 182	Brenztraubensäure 16, 139, 142, 169, 172, 182 Phosphobrenz- traubensäure 139, 142	—	—
Essigbakt. 223	Propionsäure 223	—	—

Gärprodukte und Substrate	Bildung	
	durch (Organismen usw.)	aus (Substrate usw.)
Propionsäure	Propionsäurebakt. 173 Essigbakt. 223	Glucose 173 ff., 177 Bernsteinsäure 178 Milchsäure 176, 179 Brenztraubensäure 177, 179 Glycerin 178, 179 Propanol 223
Propyraldehyd	Propionsäurebakt. 178	Glucose 178 Glycerin 178
1,2-Propandiol	Hefe 7, 150, 152 Bakterien 123	Milchsäurealdehyd 7, 150 Acetol 152 Glycerin 123
1,3-Propandiol	Bakterien 123	Glycerin 123
Sorbit	—	—
Sorbose	Essigbakt. 226	Sorbit 7, 24, 226

Umwandlung		Isolierung, Nachweis und Identifizierung	Quantitative Bestimmung
durch (Organismen usw.)	in (Umwandlungs- produkte)		
Butylbakt. 208	Propanol 208	Isolierung 174 p-Bromphenacyl- ester 174 p Chlorphenacyl- ester 224	neben Essigsäure 173
Propionsäurebakt. 178	Propionsäure 178	—	—
Essigbakt. 230	Acetol 230	—	—
—	—	—	—
Essigbakt. 226	Sorbose 7, 24, 226	—	—
—	—	Krystallisation 227	Reduktion 227, 276

Carl Ritter & Co., Wiesbaden.

Die oxydativen Gärungen. Von Dr. **K. Bernhauer**, a. o. Professor an der Deutschen Universität in Prag und Leiter der Biochemischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums. VIII, 196 Seiten. 1932. RM 16.80

Einführung in die organisch-chemische Laboratoriumstechnik. Von Dr. **K. Bernhauer**, a. o. Professor an der Deutschen Universität in Prag und Leiter der Biochemischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums. Mit 50 Abbildungen. X, 129 Seiten. 1934. RM 4.80

Grundzüge der Chemie und Biochemie der Zuckerarten. Von Dr. **K. Bernhauer**, a. o. Professor an der Deutschen Universität in Prag und Leiter der Biochemischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums. Mit 4 Abbildungen. XI, 365 Seiten. 1933. RM 32.—

Alkoholische Genußmittel. Bearbeitet von **E. Bames, B. Bleyer, G. Büttner, W. Diemair, H. Holthöfer, O. Reichard, E. Vogt.** Schriftleitung: **B. Bleyer.** (Handbuch der Lebensmittelchemie. Begründet von A. Bömer, A. Juckenack, J. Tillmans. Herausgegeben von A. Juckenack, Berlin, E. Bames, Berlin, B. Bleyer, München, J. Grossfeld, Berlin, 7. Band.) Mit 115 Abbildungen. XV, 828 Seiten. 1938. RM 99.—; gebunden RM 103.50

Untersuchungen über Enzyme. Unter Mitwirkung zahlreicher Mitarbeiter herausgegeben von **Richard Willstätter**, München. In zwei Bänden. Erster Band: XVI, 860 Seiten. 1928. Zweiter Band: XI, 915 Seiten. 1928. Beide Bände zusammen RM 111.60

Chemie der Enzyme. Von Professor Dr. **Hans v. Euler.** Dritte, umgearbeitete Auflage.

I. Teil: **Allgemeine Chemie der Enzyme.** Mit 50 Textfiguren und 1 Tafel. XI, 422 Seiten. 1925. RM 22.95

II. Teil: **Spezielle Chemie der Enzyme.**

1. Abschnitt: Die hydrolysierenden Enzyme der Ester, Kohlenhydrate und Glukoside. Bearbeitet von **Hans v. Euler, K. Josephson, K. Myrbäck** und **K. Sjöberg.** Mit 65 Textfiguren. X, 473 Seiten. 1928. RM 35.64

2. Abschnitt: Die hydrolysierenden Enzyme der Nucleinsäuren, Amide, Peptide und Proteine. Bearbeitet von **Hans v. Euler** und **K. Myrbäck.** Mit 47 Textfiguren. Autorenverzeichnis zum 1. und 2. Abschnitt. IX, 313 Seiten. 1927. RM 21.60

3. Abschnitt: Die Katalasen und die Enzyme der Oxydation und Reduktion. Bearbeitet von **Hans v. Euler, W. Franke, R. Nilsson** und **K. Zeile.** Mit 134 Abbildungen. XI, 663 Seiten. 1934. RM 58.—

4. Abschnitt: Die Gärungsenzyme. In Vorbereitung.

III. Teil: **Über die enzymatischen Vorgänge im Organismus.**

In Vorbereitung.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

VERLAG VON JULIUS SPRINGER/BERLIN

Katalyse vom Standpunkt der chemischen Kinetik. Von **Georg-Maria Schwab**, Privatdozent für Chemie an der Universität München. Mit 39 Figuren. VIII, 249 Seiten. 1931.
RM 16.74; gebunden RM 17.82

Die organischen Katalysatoren und ihre Beziehungen zu den Fermenten. Von Dr. **Wolfgang Langenbeck**, Professor an der Universität Greifswald. Mit 6 Abbildungen. V, 112 Seiten. 1925.
RM 7.50

Über katalytische Verursachung im biologischen Geschehen. Von **Alwin Mittasch**, Dr. phil., Dr. d. techn. Wiss. e. h., Dr. d. Landw. e. h., Heidelberg. X, 126 Seiten. 1935. RM 5.70

Katalyse und Determinismus. Ein Beitrag zur Philosophie der Chemie. Von **Alwin Mittasch**, Dr. phil., Dr. d. techn. Wiss. e. h., Dr. d. Landw. e. h., Heidelberg. Mit 10 Abbildungen. IX, 203 Seiten. 1938. RM 9.60

VERLAG VON JULIUS SPRINGER/WIEN

Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Eine Sammlung von zusammenfassenden Berichten. Unter Mitwirkung von **A. Butenandt**, Berlin, **W. N. Haworth**, Birmingham, **F. Kögl**, Utrecht, **E. Späth**, Wien. Herausgegeben von **L. Zechmeister**, Professor am Chemischen Institut der Universität Pécs. Jährlich erscheinen 2 Bände im Umfang von je etwa 320—400 Seiten. Erster Band. Mit 41 Abbildungen im Text. VI, 371 Seiten. 1938. RM 28.—
Zweiter Band. Erscheint im Frühjahr 1939.

Lehrbuch der organisch-chemischen Methodik. Von Professor Dr. **Hans Meyer**, Prag.
Erster Band: Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen. Sechste, umgearbeitete und vermehrte Auflage. Mit 207 Abbildungen im Text. XX, 886 Seiten. 1938. RM 57.—; gebunden RM 59.70
Zweiter Band: Nachweis und Bestimmung organischer Verbindungen. Mit 11 Abbildungen. XII, 426 Seiten. 1933. Gebunden RM 35.—
Dritter Band: Synthese der Kohlenstoffverbindungen.
1. Teil: Offene Ketten und Isocyclen. In zwei Hälften. XIX, 1483 Seiten. 1938. RM 135.—; gebunden RM 139.50
2. Teil: Heterocyclische Verbindungen. Erscheint 1939.

Die chromatographische Adsorptionsmethode. Grundlagen, Methodik, Anwendungen. Von Dr. **L. Zechmeister**, Professor am Chemischen Institut der Universität Pécs (Ungarn), und Dr. **L. v. Cholnoky**, Privatdozent am Chemischen Institut der Universität Pécs (Ungarn). Zweite, wesentlich erweiterte Auflage. Mit 74 Abbildungen. XIII, 354 Seiten. 1938. Gebunden RM 19.80

Zu beziehen durch jede Buchhandlung