

zung der Interessen der chemischen Industrie Deutschlands,

b) dem Bund angestellter Akademiker technisch-naturwissenschaftlicher Berufe und

c) dem Verein deutscher Chemiker

aufgebracht und nach den Beschlüssen des Kuratoriums (s. 4.) eingezahlt.

4. Die Geschäftsstelle untersteht einem Kuratorium, das für die Bereitstellung der erforderlichen Mittel zu sorgen und über ihre Verwendung zu wachen hat. Es stellt den Geschäftsführer an, gibt Richtlinien für dessen Tätigkeit, kann ihm im einzelnen Weisungen erteilen, nimmt mindestens halbjährlich Bericht und Abrechnung entgegen und erteilt ihm Entlastung.

5. Das Kuratorium besteht aus je zwei stimmführenden Vertretern der unter 3. genannten drei Verbände a), b) und c). Die Stimme eines abwesenden Vertreters eines Verbandes geht auf den anderen Vertreter über. Das Kuratorium bestimmt Vorsitzenden und Schatzmeister aus seiner Mitte.

Die Verbände haben das Recht, weitere Vertreter mit nur beratender Stimme zu Sitzungen des Kuratoriums zu entsenden.

6. Das Kuratorium tritt mindestens zweimal im Jahre zusammen. Es muß auf Antrag eines der Verbände einberufen werden. Der Geschäftsführer ist zu den Sitzungen mit beratender Stimme hinzuzuziehen, soweit es sich nicht um seine persönlichen Angelegenheiten handelt.

7. Als beratende und helfende Stelle kann ein Beirat geschaffen werden, dessen Mitglieder aus den Kreisen von Industrie, Wissenschaft, Behörden nach Anhören des Geschäftsführers vom Kuratorium ernannt werden.

8. Diese Satzung kann vom Kuratorium jederzeit geändert werden. Jedoch ist das Inkrafttreten der Änderung auf Antrag eines der drei Verbände bis zu dem nächsten Termin hinauszuschieben, zu welchem dem Verbands nach 9. der Austritt aus der „Karl Goldschmidt-Stelle“ möglich ist.

9. Jeder der drei Verbände ist berechtigt, die Beteiligung an der „Karl Goldschmidt-Stelle“ zum Schlusse des Geschäftsjahres mit dreivierteljähriger Frist zu kündigen, jedoch nicht vor dem 31. März 1927 zum 31. Dezember 1927. In einem solchen Falle löst sich die „Karl Goldschmidt-Stelle“ auf. Vorhandene Mittel werden zu gleichen Teilen an die drei Verbände verteilt.

10. Diese Satzung tritt am 20. März 1926 in Kraft.

## Die Assimilierbarkeit des Stickstoffs der Nährstoffe durch die Hefe beim Lufthefeverfahren.

Von Dr. H. CLAASSEN, Dormagen.

(Eingeg. 15. Jan. 1926.)

So wie die Ansichten über die Assimilierbarkeit der stickstoffhaltigen Bestandteile der Futterstoffe, besonders der Aufbau- oder Abbaustoffe des Eiweißes, und der Ammoniumsalze durch Tiere noch nicht geklärt sind, wie besonders aus der zusammenfassenden Abhandlung von Scharrer und Stobel<sup>1)</sup> hervorgeht, so sind sie auch sehr verschieden über die Assimilierbarkeit des Stickstoffs durch die Hefe aus ihren Nährlösungen. Die Sachlage ist hier allerdings insofern etwas einfacher, als für Hefe nur gelöste stickstoffhaltige Verbindungen in Betracht kommen, wenigstens für ihr Wachstum bei dem Lüftungsverfahren zur Herstellung von Preßhefe.

Die bei diesem Verfahren in neuerer Zeit hauptsächlich gebrauchten Rohstoffe sind Melasse, Malzkeime und Ammoniumsalze, daneben auch vielfach, je nach den Marktverhältnissen, Malz, Mais und Roggen.

Versuche über die Assimilierbarkeit der löslichen stickstoffhaltigen Bestandteile dieser Rohstoffe sind bereits vielfach angestellt worden, teils durch Versuche auf Platten oder in Kölbchen, teils durch Versuche in kleinen

Gefäßen unter Anwendung des Lüftungsverfahrens. Bei den ersteren sind Reinkulturen verschiedener Hefearten angewandt worden, während bei den letzteren gewöhnlich Preßhefen des Handels oder auch Stellhefen des Lufthefebetriebs genommen wurden. Letztere sind ein Gemenge mehrerer Hefearten, die jede Hefefabrik für ihren Bedarf züchtet, während die Preßhefen des Handels neben diesen Hefearten noch mehr oder weniger Kahlhefe und Torulahefe enthalten, die sich während der Lüftung in der Nährlösung neben den Kulturhefen entwickeln.

Während die für die Preßhefeherstellung geeigneten Kulturhefen wahrscheinlich kaum eine verschiedene Fähigkeit zur Aufnahme des Stickstoffs desselben Nährstoffes zeigen, ist die Fähigkeit der Kahlhefen zur Aufnahme der stickstoffhaltigen Nährstoffe sehr verschieden von der der Kulturhefen. Von den Bestandteilen der Melasse wird z. B. das Betain nach Ehrlich<sup>2)</sup> bei der Gärung in kleinen Kölbchen ohne Lüftung von den Kulturhefen gar nicht aufgenommen, dagegen von Kahlhefen und Schimmelpilzen sehr gut und reichlich assimiliert. Ähnliche Verschiedenheiten haben sich nach Lindner<sup>3)</sup> bei Assimilationsversuchen mit den Abbauprodukten des Eiweißes gezeigt, wie z. B. bei Asparagin, Asparaginsäure, Leucin, Tyrosin usw. ferner auch bei Kaliumnitrat und sogar auch bei Ammoniumsalzen.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um Versuche, die zur Aufklärung der Verhältnisse bei dem praktischen Betriebe des Lufthefeverfahrens dienen sollen. Daher beziehen sich die Ergebnisse der Versuche nicht auf die Assimilationsfähigkeit einer einzigen Hefeart, sondern auf die verschiedener Kulturhefen, mit denen Kahlhefen und Torula vermennt sind, die entweder schon in ganz geringen Mengen in der Anstellhefe enthalten sind oder sich erst während der Lüftung entwickeln. Bei der nachgewiesenen Verschiedenheit in der Fähigkeit dieser verschiedenen Hefen, die einzelnen stickstoffhaltigen Bestandteile der Rohstoffe zu assimilieren, kann man nicht erwarten, daß man bei derart ausgeführten Assimilationsversuchen ganz gleichartige Ergebnisse erhält; je nach dem Mengenverhältnis an Kahlhefen und Torula wird die Assimilation der von den Kulturhefen nicht oder nur langsam, von den anderen Hefen aber gut aufgenommenen stickstoffhaltigen Verbindungen, z. B. des Betains, etwas verschieden sein. Nach Staiger<sup>4)</sup> enthalten die Preßhefen des Handels bis zu 50% Kahlhefen und Torula. Derartige Hefen wurden aber bei den Versuchen als Anstellhefen nicht verwandt, sondern im allgemeinen nur solche, deren Gehalt an Kahlhefe und Torula schätzungsweise 5–10% nicht überstieg. Nur in einzelnen Fällen wurde eine Hefe genommen, in der durch doppelte Vergärung und Lüftung absichtlich die Menge der Kahlhefe etwas erhöht wurde.

Bei allen solchen Versuchen, die dem praktischen Betrieb angepaßt sind, ist schließlich noch zu beachten, daß einerseits eine Hefeart durch die andere günstig oder ungünstig beeinflusst wird (nach Lindner unterstützen z. B. Kahlhefen die Kulturhefen bei dem Wachstum in Lösungen mit Ammoniumsalzen), andererseits auch zuweilen gewisse stickstoffhaltige Stoffe allein schlechter oder langsamer assimiliert werden, als mit anderen zusammen.

Assimilationsversuche mit den löslichen, stickstoffhaltigen Nährstoffen der oben genannten Rohstoffe nach

<sup>2)</sup> Ztschr. für Zuckerindustr. 1914, S. 158.

<sup>3)</sup> Betriebskontrolle, V. Aufl., S. 282.

<sup>4)</sup> Brennerei-Ztg. 1925, Nr. 1678.

<sup>1)</sup> Z. ang. Ch. 38, 601 [1925].

dem Lüftungsverfahren sind bereits mehrfach angestellt worden. Wohl<sup>5)</sup> hält auf Grund seiner Versuche den Stickstoff des wässerigen Auszuges von Malzkeimen ebenso wie den der Ammoniumsalze für voll wirksam, obwohl bei seinen Versuchen von dem Stickstoff des Malzkeimauszuges nur 63%, von dem des Ammoniumsalzes nur 88% in der erzeugten Hefemasse gefunden wurden.

Wendel und Staiger, die ihre Versuche als Vertreter der Versuchsanstalt für Hefeindustrie am Institut für Gärungsgewerbe ausgeführt haben, leiten aus ihren Versuchen eine viel geringere Assimilierbarkeit des Stickstoffs in Malzkeimauszügen ab, die sie mit 50% als Durchschnittszahl angeben. In der Melasse fanden sie nur 20–45% des Gesamtstickstoffs assimilierbar, während sie den Stickstoff der Ammoniumsalze als voll assimilierbar ansehen, obwohl sie Versuche damit nicht anführen (Brennerei-Zeitung 1922, S. 1509 u. ff., 1925, S. 1663).

Bei allen diesen Versuchen ist aber nicht die Menge des assimilierbaren Stickstoffs gefunden worden, sondern die Menge Stickstoff, um welche sich die Stickstoffmenge der Hefe vermehrt hat. Daß die beiden Begriffe des assimilierbaren und des assimilierten Stickstoffs, d. h. der Menge, um welche der Stickstoffgehalt der Hefe zugenommen hat, im Hefegewerbe und auch von dem Institut für Gärungsgewerbe nicht auseinander gehalten werden, hat schon viel Verwirrung hervorgerufen, wie das Lafer in seinem Handbuch der technischen Mykologie (Bd. IV, 106) auch schon beklagt hat.

Assimilierbar ist der Stickstoff, der von der zu untersuchenden Hefe unter den günstigsten Versuchsbedingungen aufgenommen wird, einschließlich der Menge, die nach der Aufnahme infolge des Stoffwechsels wieder ausgeschieden wird.

Assimiliert ist nur die Menge Stickstoff, die nach Beendigung eines Versuchs, gleichgültig wie er ausgeführt ist, als Zunahme der Stickstoffmengen in der Hefe gefunden wird.

Durch Versuche kann unmittelbar nur der letztere, der assimilierte Stickstoff gefunden werden. Weil dieser für den technischen Betrieb natürlich auch von Wichtigkeit ist, so hat man sich daran gewöhnt, ihn unrichtiger Weise als den assimilierbaren zu bezeichnen. Dabei hat man aber sich nicht einmal bemüht, diese Versuche unter möglichst günstigen Versuchsbedingungen auszuführen oder den Nachweis zu führen, daß in der vergorenen Nährlösung nicht noch Stickstoff verblieben ist, der bei wiederholter Vergärung aufgenommen werden könnte. Kurz alle Zahlen, die bisher über den angeblich assimilierbaren Stickstoff veröffentlicht sind, sind unter willkürlich gewählten Versuchsbedingungen und ohne Prüfung des Ergebnisses auf seine Vollständigkeit hin ermittelt worden und sind daher auch nicht einmal brauchbare Zahlen für den assimilierten Stickstoff.

Versuche, durch welche der von der Hefe tatsächlich aufgenommene Stickstoff ermittelt werden soll, müssen daher, wenn sie gleichzeitig zur Ermittlung des assimilierbaren Stickstoffs dienen sollen, unter möglichst günstigen Versuchsbedingungen ausgeführt werden, und die einmal vergorene Nährlösung muß unter Zusatz von vergärbarem Zucker und von neuer Anstellhefe nochmals oder wiederholt vergoren werden. So gefundene Zahlen für den in maximo assimilierten Stickstoff bilden dann die Grundlage für die Berechnung des assimilierbaren. Dieser ist die Summe des in der Hefe neu zugewachsenen Stickstoffs und des während des Wach-

tums ebenfalls aufgenommenen, dann aber durch den Stoffwechsel wieder ausgeschiedenen und an die Nährlösung abgegebenen Stickstoffs. Dieser Stoffwechsel-Stickstoff wird in löslichen organischen Verbindungen ausgeschieden, die von der Hefe nicht mehr assimiliert werden.

Die Menge dieses in den Stoffwechselprodukten enthaltenen Stickstoffs läßt sich, wie weiter unten gezeigt werden wird, nur bei Verwendung von Ammoniumsalzen als Stickstoffquelle unmittelbar bestimmen, bei der Verwendung organischer Stickstoffverbindungen aber nur mittelbar berechnen, wie ebenfalls später angegeben wird.

#### Ausführung der Assimilationsversuche.

Die Versuche wurden von dem Leiter unseres Versuchslaboratoriums, Dr. J. Weber ausgeführt. Die Frage, welche Verhältnisse für Versuche zur Bestimmung der Assimilation stickstoffhaltiger Nährstoffe bei der Vergärung unter Lüftung die günstigsten sind, läßt sich mit Sicherheit nicht beantworten. Es wurde daher für die Versuche eine Arbeitsweise gewählt, die der bei der Herstellung von Preßhefe im großen Betriebe ähnlich ist; die so erhaltenen Ergebnisse sind als Mindestzahlen für den in der Hefe zugewachsenen Stickstoff zu betrachten, die bei einer für das Wachstum der Hefe günstigeren Änderung der Versuchsbedingungen, besonders bez. der Luftmenge, des Säuregehalts und der Temperaturen, mehr oder weniger höher werden können.

Das Versuchsgärgefäß hatte einen quadratischen Querschnitt von 15 cm Seitenlänge und eine Höhe von 60 cm und war mit auf dem Boden liegenden, fein gelochten Luftverteilungsrohren versehen. Zur Regelung der Temperatur war es in ein größeres Gefäß, das mit Wasser gefüllt war, gestellt.

In das Gärgefäß wurde die abgewogene Nährlösung (bestehend aus Zucker, dem stickstoffhaltigen Nährstoff, Phosphorsäure und vielfach auch etwas Kalium- und Magnesiumsalzen, alles gelöst in Brunnenwasser von 16° Härte), unter Zusatz abgewogener Mengen Stellhefe gegeben. Als Stellhefe wurde teils normale Stellhefe des Betriebes, die nachweisbare Mengen Kahlhefe nicht enthielt, genommen oder Versandhefe, die schätzungsweise 5–10% Kahl- und Torulahefe enthielt.

Die Vergärung wurde unter Zusatz der notwendigen Zugaben von Phosphorsäure, Kali usw. und unter Einhaltung der im großen Betriebe üblichen Temperaturen und Säuregrade vorgenommen, zuweilen auch bei fast neutraler Reaktion, wenn dies bei einzelnen Stoffen vorteilhaft erschien. Jeder Gärversuch dauerte 10 Stunden bei Temperaturen, die von 23–24° allmählich auf 31° gesteigert wurden. Gelüftet wurde anfangs mit 10–20 l Luft in der Minute, bei der Hauptgärung mit 25–50 l und zum Schluß wieder mit 10–20 l.

Nach der Beendigung der Gärung wurde die Hefe von der vergorenen Lösung abgefiltert. Als Filter erwies sich eine kleine Porzellannutsche, deren Siebboden zunächst mit Filterpapier und dann mit einer Asbestschicht belegt wurde als am geeignetsten, um schnell ein völlig klares Filtrat zu erhalten. Diese Nutsche hatte nur den Nachteil, daß das Gewicht der gewonnenen Hefe nicht völlig genau bestimmt werden konnte, da der Wassergehalt des Filtermaterials bei verschiedenen Versuchen nach dem Abnutschen um einige Gramm verschieden war; immerhin waren aber die Zahlen zur Bestimmung der Hefeausbeute und auch zur Kontrolle der anderen Zahlen genau genug; für die Assimilation des Stickstoffs wurden die Ergebnisse der Untersuchung der Nährlösungen vor und nach der Vergärung benutzt. Die vergorene Lösung wurde einschließlich des Waschwassers gewogen und darin der Stickstoffgehalt bestimmt.

Nach Beendigung der ersten Gärung wurde ein größerer Teil des Filtrats wiederum mit Zucker und den nötigen anderen Zusätzen versetzt und nochmals wie bei der ersten Gärung vergoren. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden auf die ursprünglichen Ausgangszahlen umgerechnet.

<sup>5)</sup> Z. ang. Ch. 34, 41 [1921].

Die Bestimmungen des Stickstoffs in der Hefe und in den Malzkeimen wurden nach dem üblichen Verfahren nach Kjeldahl ausgeführt, in der Melasse und in den aus der Melassevergärung entstehenden Würzen, sowie in den Betainlösungen nach der von Stolzenberg abgeänderten Methode, im Salpeter nach Devarde, des Gesamtstickstoffs in Gegenwart von Salpeter unter Zusatz von Phenolschwefelsäure und Zink, und die des Ammoniakstickstoffs durch Destillation mit Magnesia.

#### Vorversuche.

Zunächst mußte ein Weg gefunden werden, um die Menge des Stickstoffs, der von der Hefe zwar aufgenommen, dann aber wieder durch den Stoffwechsel ausgeschieden und an die Lösung abgegeben wurde, zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde Hefe in einer mit den üblichen mineralischen Nährstoffen (außer stickstoffhaltigen) versetzten Zuckerlösung, die durch Erwärmen bis auf 80–90° mit geringen Mengen Schwefelsäure sterilisiert und invertiert wurde, während 10 Stunden unter Lüftung mit 25–50 l in der Minute vergoren, also in gleicher Weise, wie für die allgemeine Ausführung der Vergärungen angegeben wurde.

Da die Hefe unter diesen Verhältnissen von ihrem eigenen Stickstoffgehalt weiter lebt und wächst, so kann angenommen werden, daß die dabei infolge des Stoffwechsels ausgeschiedenen Stickstoffmengen, berechnet auf den Stickstoffgehalt der Hefe, annähernd denen entsprechen, die bei jeder Vergärung unter ähnlichen Verhältnissen, auch bei Gegenwart von stickstoffhaltigen Nährstoffen, ausgeschieden werden.

Ein erster Versuch ergab bei Anwendung von 90 g Zucker (invertiert und gelöst in etwa 3 l Brunnenwasser) unter Zusatz von etwas Natriumphosphat und 30 g Stellhefe mit 2,28% N, daß die vergorene Lösung (3730 g) 0,001293% N enthielt, so daß von den in der Stellhefe enthaltenen 0,684 g N 0,04823 g oder 7% des Stickstoffs der Hefe durch den Stoffwechsel an die Nährlösung abgegeben wurden.

Ein zweiter Versuch ergab bei Anwendung von 200 g Zucker und 40 g Hefe mit 2,12% N, daß von den in der Hefe eingeführten 0,8480 g N an 5125 g vergorene Lösung mit 0,00135% = 0,0692 g Stickstoff oder 8,1% abgegeben waren.

Das Gewicht der Hefe hatte 12 g oder 24% zugenommen, ihr Stickstoffgehalt war auf 1,51% gesunken.

Aus diesen Versuchen ist zu folgern, daß bei der Vergärung von Zuckerlösungen bei starker Verdünnung unter Lüftung und unter den angegebenen Verhältnissen 7–8% des in der Hefe enthaltenen Stickstoffs durch den Stoffwechsel in löslichen Verbindungen an die vergorene Lösung abgegeben wurden; man kann in begründeter Weise annehmen, daß bei jeder Vergärung unter ähnlichen Verhältnissen, auch wenn stickstoffhaltige Nährstoffe vorhanden sind, ungefähr 8% des in der Hefe gefundenen Gesamtstickstoffs während der Gärung in Form löslicher, für die Hefe nicht mehr assimilierbarer stickstoffhaltiger Stoffe ausgeschieden werden.

Um also den gesamten assimilierbaren Stickstoff einer Nährlösung zu bestimmen, sind dem von der Hefe assimilierten Stickstoff ungefähr 8% des in der Hefe gefundenen Stickstoffs hinzuzuzählen, und zwar für jede Gärung besonders berechnet auf den Stickstoff der Gesamtheausbeute. Daß diese Berechnung zu richtigen Zahlen für den assimilierbaren Stickstoff führt, wird in einwandfreier Weise durch den folgenden Versuch mit Ammoniumsulfat bewiesen.

#### A. Versuche über die Assimilierbarkeit des Stickstoffs aus einzelnen stickstoffhaltigen Nährstoffen.

##### 1. Die Assimilierbarkeit des Stickstoffs des Ammoniumsulfats.

Hauptgärung: 200 g Zucker (invertiert), Auszug aus 12 g

Superphosphat, 15 g Ammoniumsulfat gelöst in ungefähr 4 l Wasser, 40 g Stellhefe mit 1,99% N.

Nachgärung: Der vergorenen Lösung wurden 150 g Zucker (invertiert) und etwas Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat auf 40 g Stellhefe zugesetzt.

Eingeführt in 15 g Ammoniumsulfat mit	20,2% N = 3,0300 g N
bei der Hauptgärung in der Würze verblieben: 4497 g mit 0,01576% N	= 0,7087 g N
von der Hefe aufgenommen	= 2,3213 g N = 76,6%
bei der Nachgärung wurden weiter aufgenommen	= 0,3485 g N = 11,9%
im ganzen aufgenommener Stickstoff	= 2,6815 g N = 88,5%
An Hefe wurde einschließlich der Stellhefe gewonnen, auf 15 g Ammoniumsulfat berechnet:	
bei der Hauptgärung 115 g mit 2,5% N	= 2,875 g N
bei der Nachgärung 67 g mit 2,0% N	= 1,340 g N
	4,215 g N

Rechnet man hiervon 8% als durch den Stoffwechsel wieder ausgeschiedenen Stickstoff = 0,337 g, so betragen diese 11,1% des Stickstoffs des Ammoniumsulfats, und der assimilierbare Stickstoff ist = 88,5 + 11,1 = 99,6%, d. h. der gesamte Stickstoff des Ammoniumsulfats ist voll assimilierbar.

Daß diese Berechnung wirklich zutrifft, läßt sich bei dem Ammoniumsulfat durch die Analyse beweisen.

Wenn noch assimilierbarer Stickstoff in der Restwürze vorhanden gewesen wäre, so müßte dieser als  $\text{NH}_3$ -Stickstoff darin nachzuweisen sein. Bei der Destillation mit Magnesiumoxyd wurde aber aus der Restwürze kein Ammoniak ausgetrieben, dagegen ergab die Untersuchung nach der Kjeldahlschen Methode eine Stickstoffmenge der Restwürze von 0,348 g N = 11,4% des Stickstoffs des Ammoniumsulfats.

Diese 11,4% N sind die Menge Stickstoff, die als Ammoniumsulfat von der Hefe assimiliert, dann aber durch den Stoffwechsel in organischer Bindung wieder ausgeschieden wurde. Es sind also 88,5% des in dem Ammoniumsulfat eingeführten Stickstoffs in der gewonnenen Hefe verblieben, 11,4% zwar aufgenommen, aber wieder ausgeschieden, so daß 99,9% tatsächlich assimilierbarer Stickstoff nachgewiesen sind. Diese durch Analysen erwiesene Zahl beweist, daß es zulässig und richtig ist, dem von der Hefe aufgenommenen Stickstoff 8% des in der Gesamtheausbeute gefundenen Stickstoffs hinzuzählen, um den assimilierbaren Stickstoff eines Nährstoffes zu finden, vorausgesetzt daß die Vergärung wie oben angegeben ausgeführt wird.

Es dürfte noch interessant sein anzuführen, daß bei der Hauptgärung von den in der vergorenen Würze gefundenen 0,7087 g N noch 0,4870 g  $\text{NH}_3$ -Stickstoff waren, also 68% und 0,2217 g = 32% Stickstoff in organischer Bindung der Stoffwechselprodukte.

##### 2. Die Assimilierbarkeit des Stickstoffs des Asparagins.

Hauptgärung: 200 g Zucker, Auszug aus 12 g Superphosphat, 15 g Asparagin mit 18,9% N, 40 g Stellhefe mit 2,10% N.

Erste Nachgärung: 150 g Zucker, 0,5 g Kaliumphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 40 g Stellhefe.

Zweite Nachgärung: wie die erste, jedoch wurde die Reaktion der Würze fast neutral gehalten.

Eingeführt 15 g Asparagin mit 18,9% N	= 2,8350 g N
bei der Hauptgärung in 4562 g Würze mit 0,03775% N verblieben	= 1,7220 g N
von der Hefe aufgenommen	= 1,1130 g N = 39,2%
bei der ersten Nachgärung weiter aufgenommen	= 0,4736 g N = 16,7%
bei der zweiten Nachgärung	= 0,3470 g N = 12,3%
im ganzen durch drei Gärungen	= 1,9336 g N = 68,2%

Da in der Restlösung der zweiten Nachgärung durch Destillation mit Magnesia noch 9 % des darin enthaltenen Stickstoffs als Ammoniak-Stickstoff gefunden wurden und durch Kalilauge sogar 21,6 % als Ammoniak ausgetrieben wurden, so ist es sicher, daß nach drei Gärungen noch erhebliche Mengen Asparagin unzersezt in der Lösung verblieben sind.

Entgegen den Angaben in den Lehrbüchern, in welchen Asparagin als vorzüglicher Nährstoff für Hefe bezeichnet wird, ergeben meine Versuche also, daß bei dem Lufthefeverfahren in saurer Lösung Asparagin nur langsam assimiliert wird. Wahrscheinlich würde bei der Fortsetzung der Versuche, also durch weitere Gärungen schließlich aller Stickstoff des Asparagins als assimilierbar gefunden worden sein, aber es hatte keinen Zweck, weitere Gärungen vorzunehmen, besonders da die Ergebnisse wegen der immer stärkeren Verdünnung unsicherer wurden.

Wird zu dem als aufgenommen gefundenen Stickstoff von 68,2 % des Stickstoffs des Asparagins die Stickstoffmenge hinzugezählt, die durch den Stoffwechsel der Hefeausbeute wieder ausgeschieden ist, so ergibt sich folgendes: Es wurden bei den drei Gärungen einschließlich der Stellhefe gewonnen

1,70 g Hefe mit 2,72 % N	= 1,904 g N
2,54 g Hefe mit 2,66 % N	= 1,436 g N
3,133 g Hefe mit 1,24 % N	= 1,649 g N
	<u>4,989 g N</u>

8 % von diesen 4,989 g N = 0,398 g N sind die Menge des assimilierten, dann aber wieder ausgeschiedenen Stickstoffs; sie ist = 14 % des Stickstoffs im Asparagin, so daß bei den drei Gärungen sich  $68,2 + 14,0 = 82,2$  % als assimilierbar erwiesen haben. Sicherlich würden aber die noch nicht aufgenommenen 17,8 % Asparagin durch weitere Vergärung assimiliert werden können.

Das Asparagin ist nach diesen Versuchen einer der Nährstoffe, der, obwohl wahrscheinlich völlig assimilierbar, von der Hefe bei dem Lüftungsverfahren in saurer Lösung nur langsam assimiliert wird, und daher bei der Vergärung der natürlichen Hefenährstoffe leicht eine geringe Assimilierbarkeit des Stickstoffs desselben vortäuschen kann, wenn man sich mit nur einer Gärung begnügt.

Ein wie wenig geeigneter Nährstoff für die Hefe das Asparagin ist, wenigstens wenn es allein oder im großen Prozentsatz angewandt wird, ergibt sich auch aus der Beschaffenheit der daraus gewonnenen Hefe; diese war bei allen drei Gärungen weich und schlecht haltbar.

### 3. Die Assimilation des Stickstoffs der Asparaginsäure.

Hauptgärung: 200 g Zucker, Auszug aus 12 g Superphosphat, 15 g Asparaginsäure mit 10,5 % N, 40 g Stellhefe mit 2,12 % N.

Nachgärung wie bei den anderen Versuchen.

Eingeführt 15 g Asparaginsäure mit 10,5 % N	= 1,5750 g N
bei der Hauptgärung in 4027 g Würze mit 0,00439 % N verblieben	= 0,1767 g N
von der Hefe aufgenommen	= 1,3983 g N = 88,8 %

An Hefe wurden bei der Hauptgärung gewonnen 135 g mit 1,70 % N = 2,295 g N. Davon sind 8 % = 0,1836 g aufgenommen, aber durch den Stoffwechsel wieder ausgeschieden, so daß diese 0,1836 g = 11,6 % in der Asparaginsäure auch assimiliert wurden, und im ganzen bereits bei der Hauptgärung  $88,8 + 11,6 = 100,4$  % assimiliert wurden.

Infolgedessen wurde bei der Nachgärung auch gefunden, daß kein Stickstoff aus der Würze der Hauptgärung mehr aufgenommen, sondern 0,019 g N an diese abgegeben wurde.

Die Asparaginsäure ist daher leicht und vollkommen

assimilierbar und einer der besten stickstoffhaltigen Nährstoffe für die Hefe. Die damit gewonnene Hefe war von normaler Beschaffenheit und Güte. Ihr Stickstoffgehalt war 1,70 %.

### 4. Die Assimilation des Stickstoffs des Betains.

Hauptgärung: 200 g Zucker, Auszug aus 16 g Superphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 20 g Betain und 100 g Stellhefe (Versandhefe) mit 2,11 % N.

Nachgärung: wie vorher.

Eingeführt 20 g Betain mit 9,2 % N	= 1,840 g N
bei der Hauptgärung in 4922 g Würze mit 0,0396 % N verblieben	= 1,949 g N
an die Würze abgegeben	= 0,109 g N

In den 100 g Stellhefe waren 2,11 g N enthalten, so daß die an die Würze abgegebenen 0,109 g N = 5,2 % davon ausmachen.

Bei der Vergärung der Hefe in Zuckerlösung allein waren aber 8 % des Hefe-Stickstoffs abgegeben worden. Es ist daher wahrscheinlich, daß von dem Betain-Stickstoff doch ein kleiner Teil, nämlich 2–3 % des Gesamtstickstoffs assimiliert worden ist.

Bei der Nachgärung wurde ebenfalls eine geringere Stickstoffabgabe an die Würze gefunden, als bei der Vergärung von Hefe ohne Zusatz, nämlich 6,1 % statt 8 %. Also auch hier sind wahrscheinlich wieder etwa 2 % des Gesamtstickstoffs aus dem Betain aufgenommen worden.

Es muß aber dahingestellt bleiben, ob diese Assimilation durch die Kulturhefe erfolgt ist. Nach den Versuchen Ehrlichs muß vielmehr angenommen werden, daß die geringen Mengen Kahlmhefen, die in der Stellhefe vorhanden waren, den Stickstoff aus dem Betain assimiliert haben.

### 5. Assimilation des Stickstoffs des Salpeters.

200 g Zucker, Auszug aus 12 g Superphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 20,04 g Kalisalpeter mit 9,67 % N und 40 g Stellhefe (Versandhefe).

Eingeführt in 20,04 g $\text{KNO}_3$ mit 9,67 % N	= 1,937 g N
in 5007 g vergorener Würze mit 0,0386 % N	= 1,930 g N

von der Hefe aufgenommen = 0,007 g N = 0,4 %

Die Hefeausbeute betrug 65 g mit 1,25 % N = 0,812 g N; von diesen sind 8 % = 0,065 g beim Stoffwechsel abgegeben worden, so daß  $0,065 + 0,007$  g = 0,072 g N oder 3,7 % von der Hefe assimiliert sind.

Diese verhältnismäßig nicht unbedeutende Menge des assimilierten Stickstoffs ist auch hier offensichtlich durch die geringen Mengen Kahlmhefen in der Stellhefe assimiliert worden; denn diese Kahlmhefen sproßten während der Gärung stark, die Kulturhefen dagegen nur ganz vereinzelt. Stickstoff in Form von Salpetersäure wird daher, wie bereits immer angegeben ist, von Kulturhefen nicht aufgenommen, jedenfalls nicht, wenn er die einzige Stickstoffquelle in der Nährlösung bildet. Von Kahlmhefen, die sich beim Lufthefeverfahren stets in der Nährlösung vorfinden, wird er assimiliert.

### 6. Die Assimilation des Stickstoffs des Harnstoffs.

Hauptgärung: 200 g Zucker, Auszug aus 12 g Superphosphat, 10 g Harnstoff mit 46,66 % N und 40 g Stellhefe (Versandhefe) mit 2,15 % N. Säuregehalt der Lösung 1,4°.

Nachgärung: 200 g Zucker, 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4$ , 40 g Stellhefe. Die Nährlösung wurde neutral gemacht und blieb auch während der Gärung neutral.

Eingeführt 10 g Harnstoff mit 46,66 % N	= 4,666 g N
bei der Hauptgärung von 5050 g Würze mit 0,07711 % N verblieben	= 3,894 g N
von der Hefe aufgenommen	= 0,772 g N = 16,5 %
bei der Nachgärung weiter aufgenommen	= 0,351 g N = 7,5 %
im ganzen	1,123 g N = 24,0 %

An Hefe wurden gewonnen:

bei der Hauptgärung 65 g mit 2,45 % N = 1,593 g N

bei der Nachgärung 71 g mit 1,70 % N = 1,207 g N

2,800 g N

8 % hiervon = 0,2240 g sind die Menge des assimilierten, aber wieder ausgeschiedenen Stickstoffs; sie ist 4,8 % des Stickstoffs im Harnstoff.

Bei den beiden Vergärungen sind nur 28,8 % des Stickstoffs im Harnstoff assimiliert. Der Harnstoff ist also ein stickstoffhaltiger Hefenährstoff, der unter den Bedingungen des Versuchs nur langsam assimiliert wird. Ob er bei fortgesetzter Vergärung schließlich zum größten Teil assimiliert wird, kann zunächst dahingestellt bleiben, ist aber wahrscheinlich; im Rahmen dieser, praktische Zwecke verfolgenden Abhandlung hatte es keinen Zweck, diese Frage durch fortgesetzte Vergärungen zu lösen.

#### B. Versuche über die Assimilation der organischen stickstoffhaltigen Bestandteile von Rohstoffen.

Die bei den neueren Verfahren im Hefegewerbe angewandten Rohstoffe sind Melasse und Malzkeime. Über die Versuche mit Melassen verschiedener Herkunft wird in einer besonderen Arbeit berichtet werden; hier folgt nur der Versuch mit Malzkeimen.

##### Assimilation des Stickstoffs in den Malzkeimen.

200 g Malzkeime wurden mit heißem Wasser wiederholt ausgelaugt, mit 30 g Superphosphat versetzt und abgefiltert. Zu 31 dieses Auszuges wurden zugesetzt 300 g Zucker (invertiert in dem angesäuerten Auszug) und 100 g Stellhefe.

Die Nachgärung wurde unter Zusatz von 150 g Zucker und 50 g Hefe ausgeführt.

Eingeführt in 3000 g Keimauszug

mit 0,0846 % N = 2,5380 g N

verblieben in 4493 g vergorener Würze

mit 0,02125 % N = 0,9548 g N

von der Hefe aufgenommen

= 1,5832 g N = 62,3 %

bei der Nachgärung wurden weiter aufgenommen

= 0,0680 g N = 2,7 %

im ganzen aufgenommener Stickstoff

= 1,6512 g N = 65,0 %

An Hefe wurden gewonnen:

bei der Hauptgärung 227 g mit 1,59 % N = 3,6093 g N

bei der Nachgärung 117 g mit 1,10 % N = 1,2870 g N

im ganzen 4,8963 g N

8 % von diesen 4,8963 g = 0,3917 g oder 15,4 % des Stickstoffs des Malzkeimauszuges wurden von der Hefe außerdem aufgenommen, aber wieder durch den Stoffwechsel ausgeschieden, so daß also durch die beiden Gärungen 65,0 + 15,4 = 80,4 % als assimilierbar nachgewiesen sind.

Jedenfalls ist die Menge des assimilierbaren Stickstoffs aber noch größer, da in dem Malzkeimauszug größere Mengen Amide enthalten sind, die, wie die Versuche mit Asparagin gezeigt haben, nur langsam und erst durch weitere Vergärungen allmählich assimiliert werden. Es sei noch erwähnt, daß bei der Hauptgärung eines anderen Malzkeimauszuges 64,3 % des Gesamtstickstoffs aufgenommen werden.

Der Stickstoff des Malzkeimauszuges ist daher als fast ganz, jedenfalls über 80 % assimilierbar anzusehen.

Aus den Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei der Vergärung und dem Wachstum nach dem Lüftungsverfahren nimmt die Kulturhefe nicht nur Stickstoff aus der Nährlösung auf, sondern scheidet gleichzeitig auch erhebliche Mengen stickstoffhaltiger Stoffe aus, die von der Hefe nicht mehr assimiliert werden können. Die Menge des so ausgeschiedenen Stickstoffs ist bei gleicher Lüftungsdauer und gesunder Hefe un-

gefähr gleich und beträgt unter den Verhältnissen der Versuche ungefähr 8 % des in der Hefe enthaltenen Stickstoffs.

2. Der aus einer Nährlösung von stickstoffhaltigen Stoffen assimilierbare Stickstoff ist gleich der Zunahme des Stickstoffs in der Hefeausschüttung oder gleich der Abnahme der Stickstoffmengen in der Nährlösung (eventuell bei mehreren Vergärungen) zuzüglich der nach 1. berechneten Menge des nach der Aufnahme wieder durch den Stoffwechsel ausgeschiedenen Stickstoffs.

3. Bei dem Lüftungsverfahren werden von der Kulturhefe der Stickstoff der Ammoniumsalze und der Amidosäuren leicht, schnell und vollständig assimiliert, der Stickstoff der Amide (Asparagin) wohl auch vollständig, aber erheblich langsamer und erst bei wiederholter Vergärung der Restwürzen, und der Stickstoff des Harnstoffes noch langsamer. Der Stickstoff des Betains und der Salpetersäure wird von Kulturhefen auch bei starker Belüftung nicht assimiliert. Die gefundenen Zahlen für den assimilierten Stickstoff sind als Mindestzahlen anzusehen und gelten nur für die Vergärung mit den einzelnen Stoffen als einziger Stickstoffquelle; bei Gemischen verschiedenartiger stickstoffhaltiger Stoffe besteht die Möglichkeit, daß diese sich gegenseitig günstig oder ungünstig beeinflussen.

4. Der Stickstoff in dem Malzkeimauszug ist mit mehr als 80 % assimilierbar gefunden; wahrscheinlich ist die Assimilierbarkeit aber größer, da die im Auszug enthaltenen Amide erst nach weiteren Vergärungen gänzlich aufgenommen werden. [A. 8.]

## Methoden der Mikrochemie.

Von Prof. Dr. F. HENRICH.

Vorgetragen im Bezirksverein Bayern des Vereins deutscher Chemiker am 21. Dezember 1925

(Eingeg. 15. Jan. 1926.)

Wohl vielen in der Praxis stehenden Chemikern ist es schon vorgekommen, daß sie mit einer sehr geringen Menge einer Substanz herausbekommen mußten, aus was sie besteht. Sie kamen bei solchen Untersuchungen von selbst auf die Mithilfe des Mikroskopes und werden das Bedürfnis nach einer mikrochemischen Methodik empfunden haben. Heutzutage verfügen wir über eine solche Methodik, die sich auf die unorganische wie die organische Chemie erstreckt, freilich ist sie noch nicht Gemeingut der Chemiker geworden. Viele Gebiete der Chemie sind bereits abschließend mikrochemisch bearbeitet, andere in der Ausgestaltung, wieder andere harren noch systematischer Behandlung, aber sicher wird man auch hier mit den bekannten Methoden Erfolg haben.

Petrographen und Mineralogen waren mit die ersten, die die Entwicklung der Mikrochemie einleiteten und förderten. Boticky veröffentlichte 1877 eine Arbeit über mikrochemische Verfahren zur chemischen Untersuchung von Gesteinen. In den achtziger Jahren des vorigen Jahrhunderts haben die Mineralogen Streng und Haushofer u. a. bereits für eine größere Anzahl von Elementen mikrochemische Reaktionen angegeben, ihnen schlossen sich später Schroeder, van der Kolk u. a. an. Bei ihnen sind naturgemäß charakteristische Kristallform und kristallographisch-optisches Verhalten als wichtigstes Kennzeichen angegeben. Anfangs der achtziger Jahre trat aber schon H. Behrens<sup>1)</sup> mit

<sup>1)</sup> Mikrochemische Methoden, Amsterdam 1882; Anleitung zur mikrochemischen Analyse anorgan. Stoffe 1894—1899; Anleitung zur mikrochemischen Analyse organischer Stoffe 1895 bis 1897; Mikrochemische Technik 1900. Neuerdings Behrens-Kley, Mikrochemische Analyse, Leipzig-Hamburg 1915.