

Holzzucker als Nährsubstrat der Citronensäuregärung.

Von Dipl.-Ing. ALFRED FREY, Freising,

Laboratorium für angewandte Chemie der Technischen Hochschule München.

(Eingeg. 20. November 1930.)

Die beachtliche Fortentwicklung der industriellen Holzverzuckerung ließ es angebracht erscheinen, die Verwendungs möglichkeit des Holzzuckers als Nährsubstrat für die Citronensäurebildung durch *Aspergillus niger* und *Citromyces* zu prüfen. Versuche dieser Art führten R. J. Allgaier, W. H. Peterson und E. B. Fred¹⁾ durch, die die Eignung des Holzzuckers, hergestellt nach dem Bergius-Verfahren und durch Hydrolyse mit verdünnten Säuren, als Substrat für die Milchsäuregärung feststellten. Sie gelangten bis zu einer Ausbeute von 90%. Daß diese Pilze bezüglich der Kohlenstoffnahrung anspruchslos sind, hat bereits R. Falk²⁾ gefunden, der nicht nur Stärke, sondern auch Cellulose als geeignetes Substrat fand. Der Holzzucker, der mir zur Verfügung stand, bestand aus einer etwa 4% reduzierenden Zucker enthaltenden Würze, die nach dem Perkolationsverfahren von Scholler-Tornesch hergestellt war (Lüers³⁾).

Es ergab sich zunächst die Notwendigkeit, die Überführung und Gewöhnung der Pilze an Holzzucker von der eigentlichen Säurebildung zu trennen. Wir versuchten das dadurch zu erreichen, daß wir auf Agar-Agar Schrägkulturen mit steigendem Holzzuckergehalt überimpften, was jedoch nur bis zu einem Gehalt von 30% Holzzucker des 9% Gesamtzucker enthaltenden Substrats (Bierwürze) gelang. Als besonders ungünstig wirkte dabei der Gehalt an Furfurol und ähnlichen Aldehyden, der etwa 0,06% betrug. Wir arbeiteten deshalb durch umfangreiche Versuche eine Reinigungsmethode aus, die darin besteht, daß die Holzzuckerwürze einer Wasserdampfdestillation unterworfen und nach Konzentration auf 10% reduzierenden Zucker mit aktiver Kohle behandelt und einer Klärung mit Eiweiß unterworfen wird. Eine uns später von der Firma C. H. Boehringer Sohn zugegangene Sorte aktiver Kohle („Englische Kohle“) reinigte so günstig, daß auf eine Eiweißklärung verzichtet werden konnte⁴⁾. Nach dieser Vorbehandlung war ein sehr gutes Wachstum der Pilze auf jenem Substrat festzustellen. Allerdings gingen die Konidien auf solchen Lösungen nur langsam in vegetative Formen über, und bereits fertig gebildete Pilzdecken ermöglichten eine schnellere Gärung. Der Verbrauch des Zuckers, begünstigt durch den großen Aschengehalt der Lösungen (der Aschengehalt einer 10%igen Holzzuckerlösung betrug 0,89%, davon etwa 25% Fe₂O₃, 30% Ca²⁺, 36% SO₄²⁻), war annähernd doppelt so schnell wie bei entsprechenden Versuchen mit Rohrzuckerlösungen. In vergleichenden Versuchen konnte festgestellt werden, daß die Ausnutzung des reduzierenden Zuckers durch *Citromyces glaber* bedeutend besser als durch Hefe ist.

Nachdem so die Übertragung durch Vorbehandlung der Holzzuckerwürze gelungen war, beschäftigten wir uns mit der Säurebildung selbst. Zur Erzielung einer möglichst hohen Ausbeute kamen von 5 Pilzstämmen hauptsächlich die beiden *Citromyces*-Stämme in Betracht, die sich besser als die zur Verfügung stehenden *Aspergillus-niger*-Stämme auf Holzwürze hatten überführen

lassen. Wir untersuchten im Verlaufe der Arbeit alle Möglichkeiten, die eine hohe Citronensäureausbeute versprechen konnten (s. experimenteller Teil). Als günstigste Temperatur ergab sich 25°, wobei die Decken zuerst immer auf Bierwürze herangezüchtet wurden und die sterilisierte Holzzuckerwürze mit und ohne Zusatz von Calciumcarbonat später zugegeben wurde. Als Nährsalze konnten nur solche mit anorganischem Stickstoff und Phosphor (und Magnesiumsulfat) angewandt werden, da hochmolekulare Stickstoffverbindungen durch die Holzwürze ausgefällt werden. Dies dürfte auf Anwesenheit gerbstoffartiger Substanzen zurückzuführen sein. Wir prüften weiter die Wirkung des Zulaufverfahrens auf eine Steigerung der Ausbeute, ebenso die der Vergrößerung der Oberfläche. Nach der ersten Methode ließen wir die sterile Holzzuckerwürze kontinuierlich im Verlauf einer Woche zufließen, nach der zweiten Methode entwickelten wir die Decken in großen 1-l-Erlenmeyern (Durchmesser in Flüssigkeitshöhe 14,5 cm) gegenüber unseren normalen 250-cm³-Kolben, deren Durchmesser in Flüssigkeitshöhe 9,5 cm betrug. Dadurch konnten wir eine Ausbeute von 16% Citronensäure, auf den angewandten reduzierenden Zucker bezogen, erreichen, während die durchschnittliche Ausbeute sonst nur 5 bis 10% absolut betrug. Gegenüber den Ausbeuten von 30 bis 40%, die durchschnittlich bei anderen Zuckerarten und auch bei Melasse erhalten werden konnten, würden jedoch auch bei einem niedrigen Preisniveau des Holzzuckers in Anbetracht der Notwendigkeit einer besonderen Vorreinigung und den allgemeinen Schwierigkeiten der Übertragung der Citronensäuregärung auf technischem Maßstab einer industriellen Verwendungsmöglichkeit noch erhebliche Schwierigkeiten entgegenstehen, die jedoch durch weitere Arbeiten wohl überwunden werden können.

Experimenteller Teil.

I. Reinigungsversuche und Überführung der Pilzstämmen auf Holzzucker.

Bei der Übertragung der Versuche auf Holzverzuckerungswürze stellten sich bereits im Anfang größere Schwierigkeiten heraus. Es erwies sich deshalb als vorteilhaft, die Beantwortung der Frage der Überführungs möglichkeit auf Holzzuckersubstrate von dem Gärungs verlauf selbst zu trennen.

Tabelle 1.

| Versuch | Pilzstamm | Zugesetzte Menge Holzwürze | Wachstumsdauer | Zucker (in g) angew. | verbraucht |
|---------|--------------------------|--|----------------|----------------------|------------|
| 1 | <i>Citromyces glaber</i> | 100 cm ³ (3,5% red. Zucker) | 75 Tage | 3,5 | 0,16 |
| 2 | <i>Citromyces glaber</i> | 100 cm ³ (1,65% red. Zucker, 1,05% d. Hefe vergärb. Zucker) | 40 Tage | 1,65 | 0,41 |
| 3 | <i>Citromyces glaber</i> | 100 cm ³ (1,65% red. Zucker, 1,05% d. Hefe vergärb. Zucker) | kein Wachstum | | |

In Versuch 1 versuchten wir zunächst die Frage zu beantworten, ob überhaupt ein Wachstum möglich ist;

¹⁾ Ind. Engin. Chem., Vol. 21, Nr. 11, S. 1039 [1929].

²⁾ Ber. Dtsch. chem. Ges. 57, 915 [1924].

³⁾ Ztschr. angew. Chem., Nr. 23, S. 455 [1930].

⁴⁾ Ich danke auch an dieser Stelle der Firma C. H. Boehringer Sohn, die diese Arbeit in freundlichster Weise unterstützte.

der minimale Zuckerverbrauch von 5% der zugesetzten Menge ließ im Zusammenhang mit der außerordentlich langsamen Entwicklung sofort erkennen, daß gärungshemmende Stoffe in größerer Zahl in der rohen Holzverzuckerungswürze vorhanden sein müssen. Auch Versuch 2 und 3 bestätigten diese Tatsache.

Wir konzentrierten deshalb die ursprüngliche Holzverzuckerungswürze mit einem Gehalt von 3,5% reduzierenden Zucker zunächst auf ungefähr 10% im Vakuum, gaben 30 g Calciumcarbonat auf ein Liter und leiteten so lange Luft hindurch, bis die Fe⁺⁺⁺-Reaktion nur noch schwach positiv war. Wir stellten nun mit dunkler gehopfter Bierwürze (Löwenbrauerei München) Mischungen mit steigendem Holzzuckergehalt her, aus diesen durch Zusatz von 2% Agar-Agar Impfkulturen und versuchten eine stufenweise Übertragung. Tabelle 2 zeigt, daß auch hier nur ein teilweiser Erfolg zu verzeichnen war. Wir impften zuerst auf Bierwürze von den Stammkulturen ab, von Bierwürze auf Mischung 1, von 1 auf 2 und von 2 auf 3. Zu übertragen suchten wir sämtliche uns zur Verfügung stehenden Stämme: *Citromyces glaber*, *Citromyces pfefferianus*, *Aspergillus niger* II, *Aspergillus niger* III, *Aspergillus niger* IV.

Tabelle 2.
Agar-Agar-Kulturen.

| Mischung | <i>Citromyces glaber</i> | <i>Citromyces pfefferianus</i> | <i>Asperg. niger</i> II | <i>Aspergillus niger</i> III | <i>Asperg. niger</i> IV |
|----------|---|--|-----------------------------|--|-------------------------|
| 1 | gleichmäßig gute Entwicklung vom 2. Tage an auf sämtlichen Kulturen | | | | |
| 2 | gleichmäßige Entwicklung etwas langsamer als bei 1 | | | | |
| 3 | gute Entwicklung am 3. Tage | keine Entwicklung trotz zweimal. Nachimpfung | gute Entwicklung am 4. Tage | Entwicklung beginnt erst 10 Tage nach der ersten Nachimpfung | gut am 4. Tage |
| 4 | ganz schwache Fortentwicklung | | kein Wachstum | | |
| 5 | | | kein Wachstum | | |
| 6 | | | kein Wachstum | | |

Zusammensetzung der Agar-Agar-Nährlösungen.

Mischung 1: reine Bierwürze. 8,44% Rohmaltose.

Mischung 2: 1 Teil Holzzucker + 9 Teile Bierwürze.

Gehalt: 7,6% Maltose, 1,08% Dextrose, 8,68% Ges.-Zucker.
(Holzzucker = 12,5% des Gesamtzuckers.)

Mischung 3: 1 Teil Holzzucker + 3 Teile Bierwürze.

Gehalt: 6,93% Maltose, 2,70% Dextrose, 9,03% Ges.-Zucker.
(Holzzucker = 30% des Gesamtzuckers.)

Mischung 4: 1 Teil Holzzucker + 1 Teil Bierwürze.

Gehalt: 4,22% Maltose, 5,41% Dextrose, 9,63% Ges.-Zucker.
(Holzzucker = 56% des Gesamtzuckers.)

Mischung 5: 3 Teile Holzzucker + 1 Teil Bierwürze.

Gehalt: 2,11% Maltose, 8,11% Dextrose, 10,22% Ges.-Zucker.
(Holzzucker = 80% des Gesamtzuckers.)

Mischung 6: Reine Holzwürze. 10,82% reduz. Zucker (Dextrose).

Die Herstellung dieser Mischungen erfolgte aus:

| Bierwürze | Holzwürze | Agar-Agar |
|---------------|---|-----------|
| 8,44% Maltose | 10,82% reduz. Zucker und Nährsalze (auf 570 cm ³ Holzwürze): | 1,5% |
| | 5 g Asparagin | |
| | 2,5 g KH ₂ PO ₄ | |
| (pH = 4,6) | 2,5 g MgSO ₄ (pH = 4,2) | |
| | je 5 cm ³ der Agar-Agar-Mischung in Impfröhrchen. | |

Die Übertragung gelang auch hier nur bis zur Mischung 3, welche einen Holzzuckergehalt von 2,7% aufweist. Eigentümlich bleibt die Nichtentwicklung von *Citromyces pfefferianus* bei Mischung 3, während sonst alle anderen Stämme, wenn auch mit Schwierigkeiten und langsam, zum Wachstum gebracht werden konnten.

Der außerordentlich hohe Gehalt an starken Geruchstoffen und an Furfurol, das sicher auf die überaus empfindliche Citronensäuregärung einen nachteiligen Einfluß ausübt, und ähnlichen Aldehyden veranlaßte uns, 500 cm³ Holzwürze (5,84% reduzierender Zucker) sauer der Wasserdampfdestillation zu unterwerfen. Das Destillat, 300 cm³, zeigte sehr stark positive Furfurolreaktion mit Anilin-Eisessig und äußerst stechenden holzartigen Geruch. Es reduzierte Fehlingsche Lösung bereits beim Stehen in der Kälte. Die Bestimmung des Reduktionswertes gab eine Zahl, die, auf das ganze Destillat bezogen, 0,570 g Dextrose entsprechen würde.

10 cm³ Lösung ergeben 42,6 mg Cu = 19,0 mg Dextrose für 10 cm³
(Destillat als Dextroselösung behandelt) = 0,570 g Dextrose für 300 cm³

Eine Pentosanbestimmung nach Dömens-Pawlowski⁵⁾ ergab 0,2591 g Phloroglucid = 0,2825 g Furfurol. Der Gehalt an flüchtigen furfurolartigen Stoffen berechnet sich also auf etwa 0,06% wasserdampfflüchtiges Furfurol. Der Rückstand zeigte einen angenehm karamellartigen Geruch und wurde mit Calciumcarbonat 3 Stunden lang gelüftet und auf 1000 cm³ aufgefüllt.

Die so vorbehandelte Würze wurde nun noch einer Reinigung mit aktiver Kohle unterworfen, von der wir verschiedene Sorten auf ihre Adsorptionsfähigkeit untersuchten.

Tabelle 3.

| Angewandte Menge Würze | Aktive Kohle | Zuckergehalt nach der Behandlung % | Farbzahl |
|--|--------------------|------------------------------------|----------|
| 1. 200 cm ³ (2,69% red. Zucker) | 5 g „Hennig F. N.“ | 2,30 | 0,8 |
| 2. 200 cm ³ (2,69% red. Zucker) | 5 g „Norit I. K.“ | 2,61 | 0,2 |
| 3. 200 cm ³ (2,69% red. Zucker) | 5 g „Norit F. K.“ | 2,49 | 0,8 |
| 4. 200 cm ³ (2,69% red. Zucker) | 5 g Bayerkohle | 2,48 | 1,5 |
| 5. 200 cm ³ (2,69% red. Zucker) | 5 g „Kreuznach“ | 2,52 | 0,4 |

Als wirksamste Kohle erwies sich Norit I. K., die gleichzeitig mit größter Absorption der verunreinigten gefärbten Produkte minimalste Zuckerabsorption vereinigt.

Das Filtrat der einzelnen Versuche wurde auf 50 cm³ eingengt, so daß der Holzzuckergehalt ungefähr 9% beträgt, je 1 cm³ Nährsalzlösung I zugesetzt (100 g NH₄NO₃, 10 g KNO₃, 10 g KH₂PO₄, 2 g MgSO₄, gelöst in 500 cm³ Wasser) und durch Zusatz von 1% Agar-Agar eine Agar-Kultur auf die übliche Weise hergestellt. Je 5 cm³ dieses Agar-Nährsubstrates wurden zu Impfkulturen verwandt, mit dem Ergebnis, daß auf sämtlichen Kulturen ohne weiteres ein normales Wachstum festzustellen war.

Damit war die Übertragung auf Holzverzuckerungswürze geglückt.

Reinigungsversuch durch Ausflockung.

Bei Zusatz einer Nährsalzlösung, die hochmolekularen organischen Stickstoff enthielt, war stets eine

⁵⁾ Pawlowski, Handbuch der brautechnischen Untersuchungsmethoden, S. 36.

Ausflockung zu beobachten. Nach kurzer Zeit beim Stehen in der Kälte, noch schneller beim Erhitzen, fällt der gesamte Aminostickstoff unter Mitreißen von Verunreinigungen tiefdunkel aus. Die abfiltrierten Lösungen waren nach eintägigem Stehen vollständig hell, da das ausfallende Eiweiß sämtliche Verunreinigungen mitgerissen hatte. Auch mit frischgefällttem Aluminiumhydroxyd ist eine weitgehende Entfärbung zu erreichen.

Wir führten nun eine Reihe von Versuchen über die Ausflockungswirkung mit verschiedenen Eiweißarten folgendermaßen durch:

Die rohe Holzwürze (4,9% reduzierender Holzzucker) wird im Vakuum auf die Hälfte ihres Volumens eingedampft und sodann der Wasserdampfdestillation unterworfen, wobei zu beachten ist, daß das Flüssigkeitsvolumen sich nicht zu stark vergrößert. Das Destillat beträgt ungefähr ein Drittel der der Destillation unterworfenen Flüssigkeit und zeigt einen intensiven Geruch nach Furfurol. Die Flüssigkeit wird noch warm mit Calciumcarbonat behandelt und gelüftet; denn die Ausflockung der kolloiden gärungshemmenden Stoffe ist bei Zusatz von Calciumcarbonat zu der warmen Flüssigkeit bedeutend größer als zu kalter. Ist die Flüssigkeit so lange gelüftet, daß keine Fe⁺⁺⁺-Reaktion mehr nachzuweisen ist oder nur noch schwache, so wird vom Calciumcarbonat abfiltriert und nun die einzelnen Versuche durchgeführt. Der Gehalt an reduzierendem Zucker beträgt 9,35%.

Tabelle 4.

| Versuch | Würze cm ³ | Zugesetztes Eiweiß bzw. aktive Kohle | Zucker- gehalt % | Farbzahl |
|---------|--------------------------|--|------------------------|----------|
| 1 | 50 | 0,1 g Gelatine, Pulverform, zum Kochen erhitzt | 8,40 | 9,0 |
| 2 | 50 | 0,1 g Gelatine, Plattenform, nicht erhitzt | 8,08 | 14,0 |
| 3 | 50 | 0,1 g Albumin, nicht erhitzt | 8,02 | 10,1 |
| 4 | 50 | + 0,1 g Albumin, zum Kochen erhitzt | 8,30 | 13,2 |
| 5 | 50 | + 2 g Norit I. K., nicht erhitzt | 7,79 | 18,2 |
| 6 | 50 | + 2 g Norit I. K., zum Kochen erhitzt | 8,95 | 12,1 |
| 7 | 50 | + 0,1 g Cymocasein, nicht erhitzt | 7,98 | 15,3 |
| 8 | 50 | + 0,1 g Cymocasein, zum Kochen erhitzt | 7,98 | 15,1 |

Die Lösung wurde nach zwölfstündigem Stehen filtriert, nach weiterem eintägigem Stehen war nochmals ein Niederschlag entstanden, der ebenfalls abfiltriert wurde. Dann blieb die Flüssigkeit klar, und es konnte die Farbbestimmung mittels des Brandtschen Colorimeters durchgeführt werden.

Auf Grund dieser Versuche führten wir zusammenfassend immer folgende Reinigungsmethode für die Vergärbarmachung der Holzzuckerwürze durch:

Die ungefähr 10% reduzierenden Holzzucker enthaltende Würze (schwach sauer) wird so lange der Wasserdampfdestillation unterworfen, bis im Destillat keine oder nur mehr schwache Furfurolreaktion nachzuweisen ist. (Das Destillat beträgt ungefähr ein Drittel der der Destillation unterworfenen Flüssigkeitsmenge.) Die von Furfurol und wasserdampfflüchtigen Geruchsstoffen befreite Würze wird warm unter Zusatz von Calciumcarbonat so lange gelüftet, bis keine Fe⁺⁺⁺-Reaktion mehr vorhanden ist. Nach Aufkochen mit ½% aktiver Kohle und Filtration der Flüssigkeit setzt man ungefähr ½% Gelatine zu und erhitzt kurz zum Sieden. Nach dem Stehen über Nacht filtriert man ab, erhitzt nochmals kurz und filtriert nach weiterem eintägigen Stehen nochmals vom ausgefallenen Niederschlag ab. Verwendet man als aktive Kohle die bereits anfangs erwähnte „englische

Kohle“, so ist eine Reinigung mit Gelatine unnötig. Die Würze kann nun vorsichtig sterilisiert werden, wobei jedoch mehr als zweimaliges und allzu langes Erhitzen einen weiteren schwachen Niederschlag hervorrufen kann, der als solcher allerdings die Gärung nicht stört. Wenn man mit Schwefelsäure schwach sauer gemacht hat (pH etwa 3,5), genügt zweimaliges Sterilisieren zur Verhütung von Infektionen bei der Citronensäuregärung vollständig.

II. Säurebildung durch *Citromyces* auf Holzzuckerwürze.

Zur Charakterisierung der Holzzuckerwürze war zunächst eine genaue Analyse der Asche und Mineralbestandteile notwendig. Die Würze wurde nach der im vorhergehenden Abschnitt besprochenen Art vorbehandelt.

| | |
|---|--|
| Zuckergehalt: | 8,52 % red. Zucker |
| Asche (von 100 cm ³) | 0,8925 g ≈ 0,89 g |
| Fe ₂ O ₃ | 0,3160 g Fe 0,2211 g = 24,76 % |
| CaO | 0,3744 g Ca 0,2615 g = 29,98 % |
| MgO | 0,0154 g Mg 0,0098 g = 1,04 % |
| SO ₄ | 0,3176 g = 35,58 % |
| N (in 100 cm ³) nach Kjeldahl | 0,006 % |
| P (Veraschung nach Neumann) | neg. |

Durch diesen hohen Gehalt an Mineralstoffen ist der äußerst rasche Verbrauch des Zuckers durch fertige Pilzdecken zu erklären.

Versuchsreihe 1.

Die Pilzdecken wurden auf Maltoselösung entwickelt (gehopfte Bierwürze, Löwenbräu München, 8,13% Rohmaltose), und zwar auf je 25 cm³. Entwicklungsdauer der Versuche selbst betrug 15 Tage. Sie zeigten einen ziemlich vollständigen Zuckerverbrauch. Die durchschnittliche Ausbeute an Citronensäure betrug 4%, bezogen auf den angewandten Zucker. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Temperaturen und den beiden angewandten Pilzen ließ sich aus dieser Versuchsreihe nicht ersehen.

Die angewandte Nährlösung besteht aus 100 cm³ Holzwürze + 2 cm³ Nährsalzlösung I + 2 g CaCO₃.

Tabelle 5.

| Versuch | Pilz | Temperatur °C | Zucker in g | | Citronen- säure (in g) Lösung Ca-Salz Gesamt | Ausbeute in % | |
|---------|--------|------------------|----------------|--------|--|------------------|------|
| | | | ang. | verbr. | | rel. | abs. |
| 4 | Glaber | 30 | 8,18 | 7,66 | 0,245 0,0904 0,3354 | 4,26 | 4,1 |
| 5 | Pfeff. | 30 | 8,18 | 7,88 | 0,269 0,0416 0,3106 | 4,06 | 3,8 |
| 6 | Pfeff. | 25 | 8,18 | 7,47 | 0,270 0,0509 0,3209 | 4,30 | 3,92 |
| 7 | Pfeff. | 25 | 8,18 | 6,58 | 0,290 0,0422 0,3322 | 5,05 | 4,06 |
| 8 | Pfeff. | 30 | 8,18 | 5,49 | 0,177 0,0341 0,2111 | 3,85 | 2,52 |
| 9 | Pfeff. | 30 | 8,18 | 2,74 | 0,124 0,0784 0,2024 | 7,39 | 2,47 |

Versuchsreihe 2 (Temperatur 25°). (Entwicklung der Pilzdecken wie in Versuchsreihe 1.)

| | | | | | | | |
|----|--------|--|------|------|--------|------|------|
| 10 | Glaber | | 4,65 | 4,45 | 0,191 | 4,29 | 4,19 |
| 11 | Glaber | | 4,65 | 4,25 | 0,242 | 5,70 | 5,21 |
| 12 | Glaber | | 4,65 | 4,40 | 0,195 | 4,4 | 4,2 |
| 13 | Pfeff. | | 4,65 | 0,25 | 0,0391 | 12,7 | 0,6 |

Die Holzwürze enthielt 8,18% reduzierenden Zucker. Unter relativer Ausbeute ist zu verstehen die Ausbeute an Citronensäure, bezogen auf verbrauchten Zucker, unter absoluter Ausbeute die Ausbeute bezogen auf angewandten Zucker.

Die angewandte Nährösung besteht aus 50 cm³ Holzwürze (9,25% reduzierender Zucker) + 1 cm³ Nährsalzlösung I. Entwicklungsdauer 20 Tage.

Die Versuchsreihe 2 wurde ohne Calciumcarbonat durchgeführt. Der prozentuale Zuckergehalt ist annähernd derselbe wie in Versuchsreihe 1. Die Oberfläche ist infolge der verringerten Flüssigkeitsmenge größer. Der auffallend geringe Zuckerverbrauch von 13 röhrt davon her, daß bei der Zugabe der 50 cm³ sterilen Holzwürze die Decke untersank und das Wachstum gehemmt wurde. Ein Vorteil des Zusatzes von Calciumcarbonat wäre aus diesen Versuchen nicht zu erkennen. Der Zuckerverbrauch ist ziemlich vollständig. Es zeigt sich in diesen wie auch in allen späteren Versuchen, daß die Schimmelpilze Holzzuckerwürze ziemlich vollständig verbrauchen bei entsprechender Vorbehandlung.

Versuchsreihe 3 (Zulaufverfahren).

(Deckenentwicklung wie in Versuchsreihe 1 und 2.)

In dieser Versuchsreihe ließen wir zu der entwickelten Decke innerhalb des ersten Teiles der Wachstumsdauer (10 Tage) die Holzzuckerwürze langsam zufließen. Versuchsanordnung: Auf einem 400-cm³-Erlenmeyerkolben saß ein Tropftrichter mit Watte im Halse festgemacht und steril abgeschlossen. Das untere Ende führte unter die Unterseite des Mycels. Im Trichter befand sich die Holzzuckerwürze und Nährösung. Die ganze Anordnung wurde sterilisiert und im Impfkasten zunächst die Bierwürzelösung geimpft. Nach 10 Tagen wurde die Bierwürze entfernt, mit sterilem Wasser nachgewaschen und dann die Holzwürze periodenweise täglich innerhalb 10 Tagen zugegeben.

Die Versuche 14 bis 16 lassen auch hier erkennen, daß starkes Wachstum vorliegt, jedoch ist die Citronensäureausbeute infolge des gesteigerten Stoffwechsels zurückgegangen. Durch den Zusatz von CaCO₃ in Versuch 17 und 18 konnte die Ausbeute dann erheblich gesteigert werden. Allerdings verdoppelte sich hier auch die Wachstumsdauer.

Die Nährösung in Versuchsreihe 3 a besteht aus 100 cm³ Holzzuckerwürze (11,3% reduzierender Zucker) + 2 cm³ Nährsalzlösung I. Die Wachstumsdauer betrug 20 Tage bei einer Temperatur von 25°.

In Versuchsreihe 3 b besteht die Nährösung aus 100 cm³ Holzzuckerwürze (9,25% reduzierender Zucker) + 2 cm³ Nährsalzlösung I + 2 g CaCO₃. Die Wachstumsdauer betrug 40 Tage bei einer Temperatur von 25°.

Versuchsreihe 3a.

| Versuch | Pilz | Zucker (in g) | | Citronensäure in Lösung (in g) | Ausbeute (in g) | |
|---------|--------|------------------|--------|-----------------------------------|--------------------|------|
| | | ang. | verbr. | | rel. | abs. |
| 14 | glaber | 11,3 | 3,27 | 0,1903 | 5,8 | 1,7 |
| 15 | glaber | 11,3 | 10,8 | 0,2223 | 2,0 | 1,62 |
| 16 | Pfeff. | 11,3 | 10,81 | 0,379 | 3,5 | 3,3 |

Versuchsreihe 3b.

| Versuch | Pilz | Zucker (in g) | | Citronensäure in Lösung (in g) | Ausbeute (in %) | |
|---------|--------|------------------|--------|-----------------------------------|--------------------|--------------|
| | | ang. | verbr. | | Ca-Salz Gesamt | rel. abs. |
| 17 | Pfeff. | 9,25 | 6,79 | 0,5667 0,0525 0,6192 | 9,12 | 6,7 |
| 18 | glaber | 9,25 | 8,78 | 1,062 0,0487 1,1107 | 12,6 | 11,95 |

Durch Vergrößerung der Oberfläche versuchten wir nun in den nächsten Versuchen eine Steigerung der Ausbeute zu erzielen.

Versuchsreihe 4.

(Versuchsgefäß 1-Erlenmeyerkolben.)

Die Entwicklung der Decken erfolgte auf je 50 cm³ Bierwürze (8,03% Rohmaltose) in 10 Tagen. Versuch 19 und 20 wurden mit *Citromyces Pfeff.*, 21 und 22 mit *Citromyces glaber* geimpft. Die vergorene Bierwürze wurde zusammen untersucht und ergab folgendes Durchschnittsresultat (in 100 cm³):

Maltose 6,03%, Citronensäure 0,5425 g, Ausbeute rel. 51,7%, abs. 10,6%.

Nach dem Auswaschen wurde die sterile Nährösung zugegeben.

Sie besteht aus:

100 cm³ Holzwürze (7,15% red. Zucker), 2 cm³ Nährsalzlösung I und 2 g CaCO₃.

Die Wachstumszeit der Versuche betrug bei einer Temperatur von 25° 10 Tage. Die Versuche zeigen eine bedeutend höhere Ausbeute (bis zu 15% absolute Ausbeute) bei glaber als bei Pfeff. und beweisen, daß innerhalb einer Ausbeutegrenze von 20% auch Holzzuckerwürze als Kohlenstoffnährsubstrat geeignet ist.

| Versuch | Pilz | Zucker (in g) | | Citronensäure Lösung (in g) Ca-Salz Gesamt | Ausbeute (in %) | |
|---------|--------|------------------|--------|---|--------------------|------|
| | | angew. | verbr. | | rel. | abs. |
| 19 | Pfeff. | 7,15 | 4,73 | 0,563 0,0583 0,6213 | 13,1 | 8,69 |
| 20 | Pfeff. | 7,15 | 4,50 | 0,523 0,0525 0,5755 | 12,7 | 8,05 |
| 21 | glaber | 7,15 | 6,53 | 0,681 0,383 1,064 | 16,3 | 14,8 |
| 22 | glaber | 7,15 | 6,62 | 0,559 0,628 1,187 | 17,9 | 16,6 |

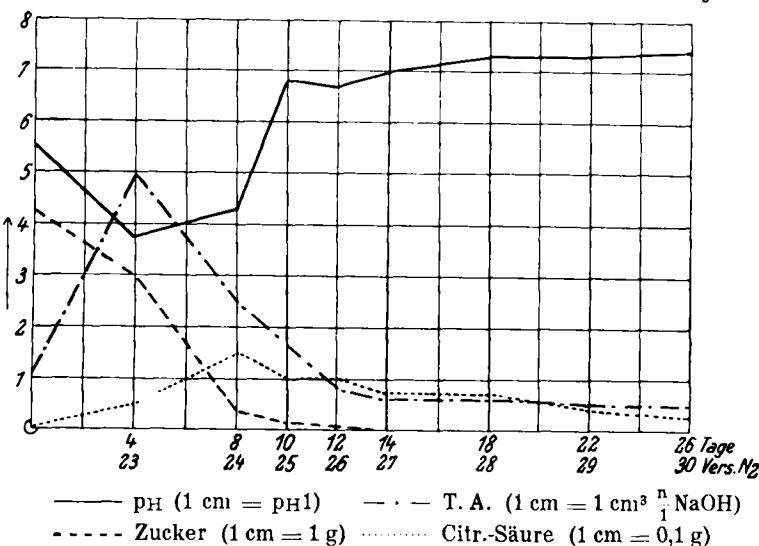
Versuchsreihe 5.

Die Versuchsreihe 5 zeigt, wie sich Holzzuckerwürze als Kohlenstoffnährsubstrat unter Berücksichtigung der Aciditätsverhältnisse und abhängig von der Versuchszeit verhält.

Da hier die Versuche ohne Zusatz von Calciumcarbonat durchgeführt wurden, konnte die Ausbeute innerhalb 8 Tagen nur bis annähernd 4% steigen, wobei sich die Säurebildung in einer Vergrößerung der [H⁺] auf pH 3,79 und 4,32 (Anfangs-pH 5,55) bemerkbar machte. Nach 10 bis 12 Tagen war bereits der gesamte Zucker verbraucht, und gleichzeitig fiel die [H⁺] auf pH 7,3. Die geringen noch anwesenden Citronensäuremengen sind als Calciumcitrat dem Verbrauch entzogen durch die in der Holzwürze vorhandenen Ca-Ionen. (Siehe Aschenanalyse.)

| Versuch | Angeb. Nähr- lösung | Dauer Tage | pH | T. A. | Zucker (in g) | | Citr.- Säure (in g) | Ausbeute (in %) | |
|---------|---------------------------|---------------|------|-------|------------------|--------|---------------------------|--------------------|------|
| | | | | | ang. | verbr. | | relat. | abs. |
| 23 | 50 cm ³ | 4 | 3,79 | 5,1 | 4,26 | 1,29 | 0,0424 | 3,28 | 0,99 |
| 24 | " " | 8 | 4,32 | 2,5 | 4,26 | 3,90 | 0,1509 | 3,97 | 3,55 |
| 25 | " " | 10 | 6,88 | 1,2 | 4,26 | 4,14 | 0,0971 | 2,34 | 2,28 |
| 26 | " " | 12 | 6,70 | 0,7 | 4,26 | 4,17 | 0,0661 | 1,59 | 1,55 |
| 27 | " " | 14 | 6,99 | 0,8 | 4,26 | 2,13 | 0,0712 | 1,72 | 1,67 |
| 28 | " " | 18 | 7,30 | 0,7 | 4,26 | 4,18 | 0,0750 | 1,80 | 1,76 |
| 29 | " " | 22 | 7,32 | 0,7 | 4,26 | 4,18 | 0,0576 | 1,87 | 1,35 |
| 30 | " " | 26 | 7,37 | 0,6 | 4,26 | 4,19 | 0,0654 | 1,56 | 1,54 |

Citromyces glaber auf Holzwürze + Nährsalz I ohne CaCO_3 .



Die angewandte Nährlösung besteht aus 50 cm^3 Holzwürze (8,52% red. Zucker) + 1 cm^3 Nährsalzlösung I und zeigt ein Ausgangs-pH von 5,55.

T. A. ist die Titrationsacidität der gesamten Lösung, in Kubikzentimeter $1/10\text{-NaOH}$ (gegen Phenolphthalein als Indikator) ausgedrückt.

Säurebildung bei verschiedenen behandelten Holzzuckerwürzen.

Zusammensetzung der angewandten Holzzuckerwürzen.

Holzwürze A: Mit CaCO_3 gelüftet und zweimal sterilisiert.

Zuckergehalt: 4,97% red. Zucker,

3,21% hefevergärbarer Zucker.

Holzwürze B: Im Vakuum eingeengt, der Wasserdampfdestillation unterworfen und mit CaCO_3 gelüftet.

Zuckergehalt: 7,23% red. Zucker,

5,75% hefevergärbarer Zucker.

Holzwürze C: Im Vakuum eingeengt, der Wasserdampfdestillation unterworfen, mit CaCO_3 behandelt, gelüftet und mit 3% aktiver Kohle (Norit I. K.) versetzt.

Zuckergehalt: 7,14% red. Zucker,

4,77% hefevergärbarer Zucker.

Wir bestimmten hier neben dem reduzierenden den hefevergärbaren Zucker, der für die Holzzuckerwürze besonders wichtig ist, und erhielten dadurch interessante Vergleiche. Die verschiedene Höhe des reduzierenden Zuckers röhrt von der verschiedenartigen Wasserdampfdestillation her. Zunächst zeigt sich allgemein, daß der hefevergärbare Zucker nicht sehr abhängig ist von der Art der angewandten Vorbehandlung. Was die Citronensäureausbeute bei Citr. glaber und Pfeff. betrifft, so gibt die am wenigsten vorbehandelte Würze A die besten Ausbeuten, dabei bleiben aber fünf Sechstel des Gesamtzuckers unausgenutzt.

| Holzwürze | A | B | C |
|-------------------|-------|-------|-------|
| Red. Zucker . . | 4,97% | 7,23% | 7,14% |
| Pilzvergärbar . . | 0,68% | 2,98% | 4,05% |
| Hefevert. . . | 3,21% | 5,75% | 4,77% |

Mit steigender Reinheit wächst der Gesamtumsatz an Zucker, aber die Ausbeute an Citronensäure sinkt. Die mit Holzwürze A erzielten Ausbeuten entsprechen einer etwa $\frac{1}{2}\%$ igen Citronensäurelösung. Bei 10% Holzwürze wäre also eine 1%ige Lösung zu erwarten, wobei noch der sehr hohe Restzuckergehalt mit Hefe vergoren werden könnte.

Versuchsreihe 6.

Entwicklung der Decken wie in Versuchsreihe 1 bis 3. Gefäße: 250 cm^3 Erlenmeyer. Entwicklungsdauer der Decken bei einer Temperatur von 25° 10 Tage. Wachstumsdauer bei einer Temperatur von 25° 10 Tage.

Die angewandte Nährlösung besteht in

Versuch 31 u. 32 aus 50 cm^3 Würze A + 1 cm^3 Nährsalzlösung I

Versuch 33 u. 34 aus 50 cm^3 Würze B + 1 cm^3 Nährsalzlösung I

Versuch 35 u. 36 aus 50 cm^3 Würze C + 1 cm^3 Nährsalzlösung I

| Vers. | Pilz | Zucker | | Citronensäure (in g) | Ausbeute | |
|-------|--------|--------|--------|-------------------------|----------|------|
| | | angew. | verbr. | | rel. | abs. |
| 31 | Pfeff. | 2,48 | 0,34 | 0,1572 | 52,2 | 8,46 |
| 32 | glaber | 2,48 | 0,48 | 0,3443 | 71,6 | 13,9 |
| 33 | Pfeff. | 3,61 | 1,78 | 0,0865 | 4,63 | 3,39 |
| 34 | glaber | 3,61 | 1,20 | 0,1682 | 14,03 | 4,66 |
| 35 | Pfeff. | 3,57 | 2,17 | 0,0836 | 3,87 | 2,34 |
| 36 | glaber | 3,57 | 1,88 | 0,1752 | 9,28 | 4,92 |

Die Citronensäure wurde in allen Fällen, um jede analytische Ungenauigkeit auszuschließen, nicht als Ca-Citrat, sondern als Pentabromacetone⁶⁾ bestimmt, nach einer Modifikation der B. G. Hartmann und F. Hilligischen Arbeitsmethode⁷⁾, die demnächst noch veröffentlicht wird.

Pflanzenphysiologische Beobachtungen bei Versuchen mit Holzzucker als Kohlenstoffnährsubstrat.

Bei einer Reihe von Versuchen, in denen Holzzucker als Substrat zur Anwendung kam, konnten Erscheinungen beobachtet werden, die von der normalen Entwicklung der Citromyces- und Aspergillusarten abweichen. Die ersten Beobachtungen, die zur Notwendigkeit einer Reinigung führten, sind oben angegeben. Das bei gewöhnlicher Entwicklung ziemlich glatte Pilzmycel wird einige Tage nach Zugabe der Holzzuckerlösung sehr stark faltig. Die Farbe der Myceloberfläche ändert sich z. B. bei Citr. Pfeff. von einem weißen Ton in einen grauen, der wohl auf gesteigerte Konidienbildung zurückzuführen ist. Die Ursache davon ist wahrscheinlich in den im Holzzucker stark enthaltenen Dextrinen und Mineralsalzen, die auch in der Bierwürze gesteigerte Konidienbildung hervorrufen, zu erblicken. Dieselbe Erscheinung war bei Citr. glaber zu beobachten. Die Unterseite des Pilzmycels, das auf Holzzucker als Substrat entwickelt oder dem diese Würze später zugesetzt wurde, ist tief braun gefärbt, während im Schnitt die Oberfläche weiß erscheint. Es findet entweder eine oberflächliche adsorptive Aufnahme oder vollständige Absorption der braunen Farbstoffe der Holzzuckerwürze in die Zelle statt. Eine andere Möglichkeit wäre die Bildung von Farbpigmenten durch die Zelle selbst, wobei die Fremdstoffe der Holzzuckerwürze als Reizstoffe dienen könnten. Bereits bei einmaliger Versuchsdauer, noch mehr aber bei mehrmaliger Benutzung derselben Pilzdecke wird das Mycel sehr leicht brüchig, während die Decke, die auf gewöhnlichem Zucker entwickelt wurde, zäh und lederartig erscheint.

Eine genaue mikroskopische Untersuchung des Pilzmycels unter dem Gesichtspunkte, ob Holzzucker eine Veränderung in der Größe der Sterigmen, Konidien usw. hervorruft, ergab keine Anhaltspunkte dafür.

Der Proteingehalt der Decken betrug nach einer Durchschnittsanalyse sämtlicher bei den Versuchen abgeernteter Decken (bei 100° getrocknet) 2,74% N = 17,1% Protein. —

Herrn Professor Lüers möchte ich auch an dieser Stelle für seine mannigfachen Anregungen, die er mir im Laufe meiner Untersuchungen zuteil werden ließ, herzlichst danken.

⁶⁾ Stahre-Kunz, Archiv f. Chemie u. Mikroskopie 1914, 298.

⁷⁾ Journ. Assoc. official agricult. Chemists 1927, 264.

Zusammenfassung.

1. Holzzuckerwürze, hergestellt nach dem Verfahren von Scholler-Tornesch, muß vor einer Anwendung als Nährsubstrat der Citronensäurebildung durch *Citromyces* besonders gereinigt werden. Insbesondere müssen die gärungshemmenden Stoffe wie Furfurol und andere Aldehyde durch Wasserdampfdestillation oder Behandlung mit aktiver Kohle bzw. anderen geeigneten Methoden entfernt werden.

2. Auf solche Weise vorbereitete Holzzuckerlösungen können als Nährsubstrate der Citronensäuregärung verwandt werden. Die Säurebildung kann durch starke Oberflächenvergrößerung bis zu einer Höhe von etwa 20% des angewandten reduzierenden Zuckers gesteigert werden. Im Durchschnitt der Versuche ist sie jedoch geringer, und die Ausbeuten betragen vorläufig nur einen Teil der bei Anwendung von reinem Zucker möglichen Ausbeute von 50% Citronensäure. [A. 160.]

Über Reaktionen mit flüssigem Chlor.

Von Prof. Dr. JULIUS MEYER und Dr. WILLI AULICH,

Anorganische Abteilung des Chemischen Institutes der Universität Breslau.

(Eingeg. 20. November 1930.)

Schon wiederholt ist die Reaktionsfähigkeit des flüssigen Chlors auf Metalle und Nichtmetalle untersucht worden, aber fast immer nur beim Siedepunkte des Chlors unter Atmosphärendruck oder bei noch tieferen Temperaturen¹⁾. Aus technischen Interessen hat A. Lange²⁾ das Verhalten des flüssigen Chlors gegen Eisen auch bei etwas höheren Temperaturen untersucht und festgestellt, daß bei Abwesenheit von Wasser keine Einwirkung stattfindet. Gegenüber Metallen hatte sich bei der Siedetemperatur des Chlors von -35° keine besondere Reaktionsfreudigkeit ergeben, selbst unedlen Metallen wie Zink, Magnesium und Aluminium gegenüber. Da wir Vanadintetrachlorid und andere, umständlich zu gewinnende Metallchloride in größeren Mengen benötigten, so haben wir versucht, flüssiges Chlor bei Zimmertemperatur und auch bei höheren Temperaturen auf Metalle einwirken zu lassen.

Bei den Versuchen oberhalb der Siedetemperatur des Chlors erwiesen sich die üblichen Einschmelzrohre von 16 mm Dmr. und 2 mm Wandstärke als nicht genügend widerstandsfähig. Da sich im flüssigen Chlor schon bei mäßigen Temperaturen stark exotherme Umsetzungen abspielen, bei denen sogar Glüherscheinungen auftreten können, so kann nur ein ganz besonders widerstandsfähiges Glas verwendet werden. Sehr geeignet erwies sich das Jenenser Felsenglas von 8 mm Dmr. und 2,5 mm Wandstärke, das sich im Sauerstoffgebläse gut bearbeiten und zuschmelzen läßt. Auch das Öffnen geschieht am besten im Sauerstoffgebläse. Derartige Röhren aus Jenenser Felsenglas wurden unten abgeschmolzen, erhielten dann bei einer Länge von etwa 25 cm einige Zentimeter unterhalb der oberen Öffnung eine Einschnürung, um das Zusammelzen zu erleichtern, und wurden dann in ein Weinhold-Gefäß mit festem Kohlendioxyd und etwas Aceton gestellt. Mittels einer Capillare wurde dann aus einer Chlorbombe getrocknetes Chlor in dieses abgekühlte Rohr geleitet, wo es sich rasch verflüssigte. Die Höhe der Säule aus flüssigem Chlor gab, da der Durchmesser bekannt war, das Volumen an. In diese Menge flüssigen Chlors, das gegebenenfalls mit Zusätzen versehen wurde, kam dann die abgewogene Menge des zu untersuchenden Metalls, worauf das Rohr oben im Sauerstoffgebläse abgeschmolzen und in ein eisernes Bombenrohr gelegt wurde. Nach Bedarf kam das Rohr dann noch in den Bombenofen, wo es auf die erforderlichen Temperaturen erhitzt

wurde. Vor dem Öffnen wurde das Glasrohr wieder in festem Kohlendioxyd-Aceton abgekühlt und erst dann geöffnet.

Zur Probe wurden derartige mit flüssigem Chlor gefüllte Rohre aus Jenenser Felsenglas auf etwa 140° , also bis zur kritischen Temperatur des Chlors, erhitzt, ohne daß sie zersprangen. Damit hatten sie eine Druckfestigkeit von 80 bis 90 at erwiesen, und es war möglich, selbst bei höheren Temperaturen auf die Metalle flüssiges Chlor in ungewöhnlich hohen Konzentrationen einwirken zu lassen. Entsprechend der hohen Chlorkonzentration sollte man die Bildung von chlorreichen Produkten, also z. B. von Vanadintetrachlorid, von Bleitetrachlorid usw. erwarten. Überraschenderweise zeigten die Ergebnisse aber häufig ein anderes Bild, wie im folgenden dargelegt werden soll.

1. Vanadin. Das metallische Vanadin wurde im Anschluß an Jul. Meyer und R. Backa³⁾ nach dem Thermitverfahren gewonnen. Zweckmäßig benutzt man die Schutzschicht aus Flußspat, in der das Gemisch aus Vanadinpentoxyd und Aluminium abgebrannt wird, mehrere Male, indem man das Thermitgemisch in dem festgebrannten Krater recht feststampft. Dadurch wird das erhaltene Produkt merklich reiner und schließt weniger Schlacke ein. Gegenüber der Meyer-Backaschen Vorschrift haben wir jetzt ein Gemisch aus 100 g V_2O_5 , 49,5 g Al und 20 g CaF_2 niedergeschmolzen, wodurch zwar die Ausbeute etwas geringer, die Reinheit mit 93,5% V aber etwas größer war.

Von diesem feingepulverten Vanadin wurden mehrere Gramm mit flüssigem Chlor überschichtet und in der Kältemischung stehen gelassen, bis nach zwei Tagen das Chlor verdampft war. Eine Einwirkung hatte nicht stattgefunden. Zusätze von Spuren Wasser und von Jod hatten keinen Erfolg. Bis zur Siedetemperatur des Chlors tritt also keine Umsetzung ein.

Bei den Versuchen im zugeschmolzenen Rohr zeigte es sich, daß die mit 0,5 bis 1,0 g feingepulvertem Vanadin und 2 bis 3 cm³ flüssigem Chlor gefüllten Röhren nach dem Herausnehmen aus der Kohlendioxyd-Aceton-Kältemischung beim Erwärmen auf ungefähr 0° explodierten, einerlei, ob sie mit oder ohne Spuren von Wasser und Jod angesetzt waren. Bei genauerer Beobachtung zeigte es sich nun, daß etwa 10 min nach dem Herausnehmen aus der Kältemischung im Rohr plötzlich eine Leuchterscheinung auftrat, die sich durch das ganze Rohr verbreitete und mit heftiger Explosion endete. Nur ein Rohr aus Jenenser Verbrennungsglas

¹⁾ Gautier u. Charpy, Compt. rend. Acad. Sciences 113, 597 [1891]; Thomas u. Dupuis, ebenda, 143, 597 [1906]; E. Beckmann, Ztschr. anorgan. allg. Chem. 51, 99 [1906].

²⁾ A. Lange, Ztschr. angew. Chem. 13, 686 [1900].

³⁾ Jul. Meyer u. R. Backa, Ztschr. anorgan. allg. Chem. 135, 177 [1924].