

und Äthylalkohol wirken im Gegensatz zu Propylalkohol in Gegenwart von 21% Borfluorid beim Kochen am Rückfluß auf Phenol nicht ein. Erst beim 3stündigen Erhitzen auf 170° wird Anisol in 58%iger Ausbeute bzw. Phenol in 17%iger Ausbeute neben wenig Alkylphenyläther erhalten.

Auch zur Alkylierung des Phenols mit Dimethyl- und Diäthyläther-Borfluorid müssen höhere Temperaturen angewandt werden. Phenol und auch Anisol werden durch mehrstündiges Erhitzen am Rückfluß (2—32 h) mit Methyläther-Borfluorid⁸⁰), das durch 3stündiges Kochen von Borfluorid-Methylalkohol dargestellt wurde⁸⁰), fortschreitend bis zum Pentamethylanisol methyliert, und Diäthyläther-Borfluorid liefert mit Phenol innerhalb 3 h bei 200° in 26%iger Ausbeute Phenol neben verschiedenen Äthylphenolen und Äthylphenyläthern⁸¹.

Die Alkylierung der Phenole wurde weiterhin auf Phenocarbonsäuren übertragen. B. W. J. Croxall, F. J. Sowa u. J. A. Nieuwland⁸²) haben in in Heptan suspendierte Salicylsäure mit 22,3 Mol.-% Borfluorid innerhalb drei Tagen bei einem Überdruck von 8—10 cm Quecksilbersäule Propylen eingeleitet. Es wird hierbei zunächst Salicylsäureisopropylester gebildet, aus dem sodann die 2-Oxy-3-isopropyl-benzoësäure entsteht. Beim weiteren Einleiten von Propylen tritt sodann erneute Veresterung zum 2-Oxy-3-isopropyl-benzoësäureisopropylester ein, aus dem sich die 2-Oxy-3,5-diisopropyl-benzoësäure bildet, die schließlich mit weiterem Propylen zum 2-Oxy-3,5-diisopropyl-benzoësäureisopropylester verestert wird. 2-Oxy-5-isopropyl-benzoësäure wird nur in geringer Menge isoliert. Propoxyderivate der Salicylsäure werden nicht gebildet.

Auch durch Erhitzen von Salicylsäureisopropylester auf 130—140° ohne Propylenzufuhr in Gegenwart von Borfluorid werden 2-Oxy-3-isopropyl-benzoësäure, 2-Oxy-3,5-diisopropyl-benzoësäure neben Spuren 2-Oxy-5-isopropyl-benzoësäure erhalten. Da sowohl aus n- als auch iso-Salicylsäureisopropylester und Salicylsäure-n-butylester Isoalkyl-salicylsäuren entstehen, aus Salicylsäureisobutylester tert. Butylsalicylsäure gebildet wird⁸³), und daneben auch freie Salicylsäure isoliert wird, ist anzunehmen, daß die Alkylierung intermediär über die Olefine verläuft. Während aber die Isopropyl- wie sek. Butylgruppe aus ihren Salicylsäureestern überwiegend in die ortho-Stellung zur OH-Gruppe wandert, tritt die tert. Butylgruppe in para-Stellung zur OH-Gruppe ein.

Mit p-Oxy-benzoësäure reagiert Propylen anders in Gegenwart von Borfluorid⁸⁴). Hierbei findet zunächst Verätherung zur p-Isopropoxy-benzoësäure statt; es wird kein p-Oxy-benzoësäure-isopropylester isoliert. Der Äther lässt sich sodann in ortho-Stellung umlagern. Die p-Isopropoxy-benzoësäure wird auch mittels Borfluorid zunächst aus p-Oxy-benzoësäure-isopropylester gebildet. Die Verfasser halten

daher eine direkte Wanderung der Isopropylgruppe des p-Oxybenzoësäure-isopropylesters in den Kern nicht für möglich; als Zwischenstufe soll der Äther entstehen, dessen Isopropylgruppe sodann eine Verschiebung in den Kern zur 3-Isopropyl-4-oxy-benzoësäure erleidet. Die 3-Isopropyl-4-oxy-benzoësäure kann aber auch, wie durch die Möglichkeit der Propylierung des Anisols gezeigt wurde, durch direkte Kernpropylierung der p-Oxy-benzoësäure entstehen.

Aus der m-Oxy-benzoësäure und Propylen in Tetrachlorkohlenstofflösung werden mittels Borfluorid als Katalysator 3-Isopropoxy-benzoësäure, 4-Isopropyl-3-isopropoxybenzoësäure und etwas m-Oxy-benzoësäureisopropylester erhalten. Mit m-Oxy-benzoësäure vermögen also wahrscheinlich Verätherung und Veresterung gleichzeitig zu verlaufen. Die Umlagerung des Isopropyläthers und Isopropylesters der m-Oxy-benzoësäure liefert als Hauptprodukt die 3-Oxy-4-isopropyl-benzoësäure. Daneben werden aus dem Äther etwas 3-Isopropoxy-4-isopropyl-benzoësäure und aus dem Ester etwas 3-Isopropoxy-4-isopropyl-benzoësäure, dessen Ester, 3-Isopropoxy-benzoësäure und m-Oxy-benzoësäure erhalten.

Die Isopropylgruppe des Salicylsäureesters wandert also unter dem Einfluß des Borfluorids direkt in den Kern, die des m-Oxy-benzoësäureesters zum größten Teil direkt in den Kern, und die des p-Oxy-benzoësäureesters wandert zunächst zur Oxygruppe und lagert sich dann in den Kern um. Daß Salicylsäure mittels Propylen nicht veräther wird, ist wohl darauf zurückzuführen, daß allgemein Ortho-oxyverbindungen, wie o-Oxysäuren und o-Oxyketone, sehr schwierig zu veräthern sind.

Nicht nur mit den Olefinen, auch mit den Alkoholen, wie Isopropylalkohol, sek. und tert. Butylalkohol, reagiert Salicylsäure in Gegenwart von Borfluorid unter Bildung von Salicylsäureestern; mit sek. und tert. Butylalkohol können auch direkt die Kernsubstitutionsprodukte der Salicylsäure erhalten werden⁸⁵). Die Reaktion findet ebenfalls unter intermediärer Bildung der Olefine statt, da mit n-Butylalkohol die sek. Butylderivate, mit tert. Butylalkohol die Isobutylderivate erhalten werden. In Gegenwart von Benzol und Diphenyläther werden auch diese Verbindungen durch die intermediär auftretenden Olefine alkyliert.

Aromatische Amine, wie Anilin und N-Alkylaniline, lassen sich mit Olefinen in Gegenwart von Borfluorid nicht alkylieren. Da diese Amine zu basisch sind, wird das Borfluorid sofort festgebunden und unwirksam gemacht. Dagegen gelingt es, schwach basische aromatische Amine, wie z. B. Diphenylamin, mit Diisobutyl in Gegenwart von Borfluorid-dihydrat zu alkylieren⁸⁵). Hierbei werden p-Diisobutyl- und p,p'-Diisobutyl-diphenylamin nebeneinander erhalten.

(Schluß folgt.)

Eingeg. 7. Oktober 1940. [A. 109.]

⁸²⁾ J. Amer. chem. Soc. **56**, 2054 [1934].
⁸³⁾ W. J. Croxall, F. J. Sowa u. J. A. Nieuwland, J. org. Chemistry **2**, 253 [1937].
⁸⁴⁾ W. J. Croxall, F. J. Sowa u. J. A. Nieuwland, J. Amer. chem. Soc. **57**, 1540 [1937].

⁸⁵⁾ D. Kästner, unveröffentlichte Versuche.

Zur Bestimmung der Hefeergiebigkeit von Rohstoffen für die Futterhefengewinnung

Von Prof. Dr. HERMANN FINK und Dr. Ing. habil. RICHARD LECHNER

Unter experimenteller Mitwirkung von R. ILLIG, J. KREBS, M. ROSS u. I. SCHLIE

Aus dem Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation der Universität Berlin

Ist die Beurteilung und Voraussage der Hefe- und Eiweißausbeuten auf Grund analytischer Feststellungen an den Rohstoffen möglich?

Bei der Futterhefeerzeugung dienen in erster Linie Kohlenhydrate als Kohlenstoffquelle. Deshalb versuchte man, diese in den Nährlösungen zu erfassen und auf Grund der mit reinem Zuckern erreichbaren Standardausbeuten die zu erwartenden Höchstausbeuten in den technischen Hefenährlösungen zu berechnen.

Für die heutige Futterhefengewinnung kommen besonders folgende Rohstoffe in Betracht:

Holzzucker nach dem Bergius-Rheinau-Verfahren,
 Holzzucker nach dem Scholler-Tornesch-Verfahren,
 Nadelholzsulfitalblaugen,
 Laubholz- (Buchenholz-) Sulfitalblaugen,
 Kartoffelmaischen und Pülehydrolysat (Eiweißschlemmeverfahren),
 Melasse,
 Schlempen verschiedener Herkunft.

In Lösungen dieser Rohstoffe, denen anorganische Nährsalze zugesetzt werden, wird die Wuchshefe *Torula utilis* unter intensiver Belüftung gezüchtet.

Die Kohlenstoffquellen für die Futterhefengewinnung liegen in recht verschiedenartiger Zusammensetzung vor (s. Tab. auf S. 282).

Im Jahre 1935, bei Beginn unserer Arbeiten über Futterhefeerzeugung aus Holzzucker, bemühten wir uns, von vornherein ein allgemeines Bezugssystem für die Ausbeuteberechnung zu schaffen. Wir bezogen damals¹⁾ die Ausbeuten auf angewandten reduzierenden Zucker, auf Reduktionsdifferenz, auf alkoholvergärbaren und auf vergärbaren Zucker.

Bei der Bestimmung des reduzierenden Zuckers werden jedoch auch die reduzierenden Nichtzuckerstoffe erfaßt und als Zucker (Glucose) berechnet, außerdem Kohlenhydrate von geringerer Reduktionskraft²⁾, wie Pentosen.

¹⁾ H. Fink, R. Lechner u. E. Heinisch, Biochem. Z. **283**, 71 [1935].

²⁾ R. Lechner u. R. Illig, Z. Spiritusind. **1939**, 273.

Nährsubstrat	Reduzierende Subst., ber. als Glucose %	Vergärbarer Zucker (Hexosen) %	Pentosen (furfurol-liefernde Stoffe), ber. als Xylose %	Gesamtstickstoff %	Art der C-Quellen
Holzzuckersirup ^{a)} (<i>Bergius-Rheinau-Verf.</i>)	41,7	33,5	5,1	0,050	Glucose, Mannose, Galaktose, Xylose, dimere reduzierende Zucker (?), polymere reduzier. Zucker (?), Essigsäure in stark wechselnden Mengen
Holzzuckerwürze (<i>Schöller-Tornesch-Verf.</i>)	3,24	2,58	0,59	0,003	
Nadelholzsulfitablaugung Nadelholzsulfitablaugung Buchenholzsulfitablaugung Buchenholzsulfitablaugung	2,47 3,01 4,49 4,21	1,22 1,98 0,35 0,41	0,41 0,64 3,58 3,11	0,008 — 0,021 —	
Kartoffelnäsche, Pülp-hydrolysat z. B.	5,66	4,47	--	0,084	Maltose (Dextrine, Saccharose), Invertzucker, organische Säuren, Aminosäuren usw.
Melasse	56,2 ^{a, b)}	51,8	0,45	2,15	Saccharose, zahlr. organ. C- und N-Quellen, besonders Aminoverbindungen

^{a)} Bei Nährsubstrat 1 und 8 bedeuten die Zahlen Gew.-Proz., bei den übrigen Vol.-Proz.

^{**)} Als Invertzucker berechnet.

(Xylose), Mannose, Galaktose und u. U. polymere Zucker, so daß die Werte zu niedrig ausfallen. Hinzu kommt noch, daß in Zuckergemischen nach Entfernung einer Komponente, z. B. durch Vergärung oder Verhefung der Glucose, eine Verschiebung der Reduktionskraft eintritt, so daß die ermittelten restlichen Kohlenhydratmengen nicht den tatsächlich vorhandenen, die in diesem Falle größer sind, entsprechen. Andererseits ist mit der möglichen Anwesenheit von nicht reduzierenden dimeren Zuckern oder solchen dextrinartiger Natur zu rechnen, die bei der Reduktionsbestimmung nicht erfaßt wurden. Dabei ist von der Frage der Hefe-Assimilierbarkeit und der jeweils möglichen Höchstausbeute aus den einzelnen Zuckerguppen, die eine weitere Komplikation mit sich bringt, noch vollständig abgesehen.

Für die Reduktionsdifferenz, die durch Bestimmung des reduzierenden Zuckers vor und nach der Hefezüchtung als Differenz die Menge des verschwundenen reduzierenden Zuckers angibt, gelten dieselben Einwände. Dazu kommt, daß sich im Laufe der Züchtung reduzierende Stoffe, z. B. Aldehyde, bilden können, die in der verheften Lösung eine größere Zuckermenge vortäuschen.

Der im Gärversuch durch Bestimmung des Alkohols und Umrechnung nach der *Gay-Lussacschen* Gärungsgleichung ermittelte „alkoholvergärbare“ Zucker¹⁾ gibt auch nicht die wirklich vorhandene Menge an vergärbarem Zucker an, sondern weniger. Bei der Vergärung wird ein Teil des Zuckers nicht zu Alkohol, sondern anderweitig umgesetzt. Bringt man einen entsprechenden Korrekturfaktor an — wir rechneten mit dem Faktor $\frac{1}{0,88}$ —, so erhält man den tatsächlich vor der Gärung vorhandenen Zucker, „vergärbarer Zucker“ genannt. Die Zugrundeliegung des vergärbaren Zuckers ist gut brauchbar, wenn in der Nährlösung keine anderen hefeassimilierbaren C-Quellen anwesend sind.

H. Lüers u. E. Möricke²⁾ bezogen die Hefeausbeuten auf sog. vergärbaren Zucker. Diesen ermittelten sie aus der Differenz des auf dem Reduktionswege bestimmten Gesamtzuckers und der nach der Barbitursäuremethode bestimmten Xylosemenge und setzten die so erhaltene Zuckermenge als Glucose in Rechnung.

Als jedoch nicht zu Alkohol vergärbare Hexosen⁴⁾, Pentosen oder Nichtzuckerstoffe in den Hefenährlösungen und deren Ausnutzung bei der Verhefung nachgewiesen wurden, mußten vergärbarer Zucker bzw. Reduktionsdifferenz als Bezugssystem fallen gelassen werden.

Durch den von *Fink, Krebs u. Lechner⁵⁾* erbrachten Beweis, daß Essigsäure von *Torula utilis* zum Zellaufbau ausgenutzt wird, konnten in essigsäurehaltigen Substraten wie Holzzuckerlösungen und insbes. Sulfitablaugen aus Laubholz und auch Nadelholz der vergärbare Zucker und die Reduktionsdifferenz nicht mehr als Grundlage zur Beurteilung der Ausbeute dienen. Als es dann *Lechner⁶⁾* gelang, die Verwertung der Pentosen bei der Verhefung zu erreichen, konnte in pentosenhaltigen Hefenährlösungen höchstens noch die Reduktionsdifferenz, auf keinen Fall aber mehr der vergärbare Zucker als Maßstab für die Ausbeutebeurteilung dienen.

^{a)} Z. Spiritusind. 1936, 384.
^{b)} Ebenda 290, 135 [1937].

⁴⁾ R. Lechner u. R. Illig, Biochem. Z. 299, 174 [1938].
⁵⁾ Ebenda 300, 204, 301, 170 [1939].

Wir bezogen daher in pentosenhaltigen Nährösungen wie Holzzucker und Sulfitablaugen aus Nadelholz die Hefeausbeuten auf Gesamtzucker, d. h. auf die Summe vergärbarer Zucker plus Pentosen. Um auch bei nicht vollständiger Verhefung der Kohlenhydrate die Ausbeuten auf verbrauchte Kohlenhydrate berechnen zu können, wandten wir noch ein anderes Bezugssystem, nämlich vergärbarer Zucker plus Pentosendifferenz (= verschwundene Pentosenmenge) an. Holzhydrolysat, insbes. Buchenholzsulfitablaugen, enthalten bisher nicht verhefbare Uronsäuren, die bei der Salzsäuredestillation Furfurol liefern und die Pentosenbestimmung stören. In Holzzuckerlösungen und Buchenholzsulfitablaugen, die vornehmlich Pentosen und Essigsäure enthielten, wurde versucht, durch Einführung des Begriffs „verhefbare Substanz“ alle verhefbaren C-Quellen für die Ausbeuteermittlung zu berücksichtigen⁷⁾. Die analytische Erfassung ist aber umständlich und zeitraubend. Außerdem lassen verschiedene Anzeichen vermuten, daß z. B. in Sulfitablaugen noch weitere unbekannte verhefbare Nichtkohlenhydrate enthalten sind.

Ein weiterer Vorschlag, der allerdings mehr zur Beurteilung, weniger zur Vorhersage der Hefeausbeuten aus verschiedenen Substraten und zu Betrachtungen über die Stoffökonomie dienen sollte, stammt von *H. Fink u. H. Münder⁸⁾*. Sie legen den Kohlenstoffgehalt einerseits des Nährsubstrates, andererseits der Hefeernte zugrunde. Für die Verhefung, z. B. reiner Glucose unter Zusatz (kohlenstofffreier) mineralischer Nährsalze ergibt sich in der Theorie⁹⁾ ein Kohlenstoffausnutzungsgrad von 66%, d. h. $\frac{2}{3}$ des Kohlenstoffs der Glucose können in Hefezellsubstanz eingebaut werden. Im praktischen Standardzüchtungsversuch wurde allerdings nur eine rd. 60%ige Ausnutzung erreicht. Dieses zweifellos eindeutige und genaue Bezugssystem hat aber verschiedene Nachteile, die seiner allgemeinen Einführung entgegenstehen; so fehlen für die meisten gebräuchlichen Substrate die statistischen Daten über den C-Gehalt, und außerdem ist die Kohlenstoffbestimmung auf nassem Wege nicht ganz einfach in Reihenanalysen durchzuführen.

Bei einem anderen technischen Nährsubstrat, der Melasse, werden Aminosäuren bei der Verhefung mit ausgenutzt, worauf schon *Claassen¹⁰⁾* aufmerksam machte. Die analytische Erfassung des assimilierbaren Aminosäureanteils gelingt aber nicht zufriedenstellend.

Besonders schwierig und unübersichtlich gestaltete sich die Beurteilung der Ausbeuten bei der Verhefung von Kartoffeln. Die verhefbare Substanz stellt zwar im wesentlichen die diastatischen Abbauprodukte der Stärke dar, doch ist auch noch mit geringen Mengen anderer hefeassimilierbarer Stoffe zu rechnen. Dazu kommt, daß die Züchtung der Hefe nicht wie üblich in einer klaren Flüssigkeit, sondern in der heterogenen, breiförmigen Maische erfolgt, die ähnlich wie in der Kartoffelbrennerei aus Kartoffeln mittels Grünmalz (als Diastaselieferant) hergestellt wird. Die neugebildete Hefe kann zum Zweck der Analysierung von den festen Maischebestandteilen nicht abgetrennt werden, so daß Hefe- bzw. Rohproteinzuwachs nur auf indirektem Wege ermittelt werden können. Wir bezogen deshalb die Eiweißausbeuten im wesentlichen auf die Alkoholergiebigkeit (Stärke) der Maischen und auf den Schwund an Trockensubstanz bei der Lüftung.

In den bisherigen Darlegungen wurde gezeigt, daß es schon größte Schwierigkeiten bereitet, die einzelnen Komponenten (Individuen), aber auch Stoffgruppen in den kompliziert zusammengesetzten Rohstoffen für die Futterhefengewinnung nebeneinander analytisch zu erfassen bzw. aus den Zahlenergebnissen Schluß auf die zu erwartende Ausbeute an Hefetrockensubstanz zu ziehen. Dazu kommt nun noch eine weitere Komplikation, die man am besten unter den von *Fink* geprägten Begriff¹¹⁾ der „überadditiven Ausbeute“ zusammenfaßt.

Fink u. Krebs¹²⁾ stellten nämlich fest, daß man bei der Verhefung von Gemischen von zwei definierten verhefbaren Stoffen, wie Glucose und Alkohol, Glucose und Essigsäure, Glucose und Milchsäure usw., nicht die zu erwartende Summe der Einzelausbeuten, sondern oft ganz beträchtlich höhere,

⁷⁾ R. Lechner, diese Ztschr. 53, 163 [1940].

⁸⁾ Vorratspflege u. Lebensmittelorsch. 2, 371 [1939]; Wschr. Brauerei 56, 201 [1939].

⁹⁾ H. Fink, J. Krebs u. R. Lechner, Biochem. Z. 301, 143 [1939].

¹⁰⁾ Z. Ver. dtsch. Zuckerind., Techn. Teil 84, 713 [1934]; Z. Spiritusind. 1934, 159.

¹¹⁾ Svensk kem. Tidskr. 50, 177 [1938].

also „superadditive“ Ausbeuten erhält. Fink u. Illig¹³⁾ haben neuerdings eine größere Menge solcher Stoffpaare untersucht.

Wie die Ausführungen zeigen, kann also die Beurteilung der Hefe- und Eiweißausbeuten aus einem gegebenen Nährsubstrat an Hand analytisch erfaßbarer Substratkomponeenten in den meisten Fällen nicht befriedigen; sie ist aber trotzdem wichtig, da sie oft interessante Einblicke bei der Verhefung gewährt.

Die direkte Bestimmung der Hefe bzw. Eiweißausbeute im praktischen Züchtungsversuch.

Wir führten deshalb den Begriff der „Hefeergiebigkeit“ in Analogie zur Alkoholergiebigkeit ein und verstehen darunter diejenige Hefemenge (*Torula utilis*), die aus einer bestimmten Menge eines Nährsubstrates unter optimalen Bedingungen in einer festgelegten Verhefungsapparatur erhalten werden kann. Damit sind alle Schwierigkeiten und Unsicherheiten, die einerseits der analytischen Erfassung der einzelnen Bestandteile der Nährösungen und andererseits deren Auswertung anhaften, beseitigt. Als Bezugssystem für die Hefe- bzw. Rohprotein ausbeute gilt lediglich ein bestimmtes Volumen oder eine bestimmte Gewichtsmenge des Hefenährsubstrates. Die Energiebigekeit an Hefe bzw. Rohprotein kann dann natürlich weiter umgerechnet werden, z. B. bei Holzzuckerlösungen auf eine bestimmte Holzmenge usw.

Als Analysenapparatur verwenden wir die von uns in den letzten Jahren entwickelte Standardapparatur für Hefezüchtung. Die hierfür aufgestellten Standardbedingungen, die auf eine bestimmte Menge einer verhefbaren C-Quelle eingestellt waren, erfahren dabei insofern eine Abänderung, als sie auf optimale Wirkung bei der Verhefung undefinierter Nährösungen abgestellt sein müssen.

Apparatur.

Die Züchtungsapparatur (Abb. 1) besteht aus einem oder mehreren Glaszylinern von je 100 cm Höhe und 10 cm lichtem Durchmesser mit einem Inhalt von etwa 8 l. An den Enden sind die Glaszyliner mit geschliffenen konischen Glaswülsten versehen, so daß mehrere Zylinder übereinander gesetzt und durch geeignete Gummidichtungen mit Leichtmetallflanschen vollkommen gasdicht verbunden werden können. Es entsteht so eine turmartige, oft mehrere Meter hohe Anordnung, die ebenso wie jede Einzelröhre durch eine Bodenplatte bzw. eine Deckplatte gasdicht verschlossen werden kann. An den Glaszylinern sind außerdem noch ein oder zwei Glastuben seitlich angebracht, die zur Aufnahme von Meßinstrumenten verschiedener Art (Thermometer, registrierende Temperaturschreiber, registrierende pH-Messungen usw.) dienen können. An der verzinnten Bodenplatte können verschiedenartige Belüftungskörper auswechselbar angebracht werden; eine sehr feine Luftverteilung gewährleisten Porolithkerzen. Durch die Bodenplatte führt ferner eine verzinnte¹⁴⁾ Metallrohrschlange für Kühlung mit kaltem Wasser oder für Heizung mit warmem Wasser, das durch Einschalten eines in die Wasserzuleitung eingebauten elektrischen Heizkörpers erzeugt wird. Endlich ist noch eine Öffnung zum Ablassen der Flüssigkeit sowie für Probenahmen an der Bodenplatte vorgesehen.

Die Apparatur ist i. allg. oben offen. Werden jedoch der bei der Verhefung entstehende Alkohol und die Kohlensäure bestimmt, so kann die Apparatur mit einer verzinnten Deckplatte verschlossen werden. Diese wird ebenfalls mittels Flanschen- und Gummidichtung

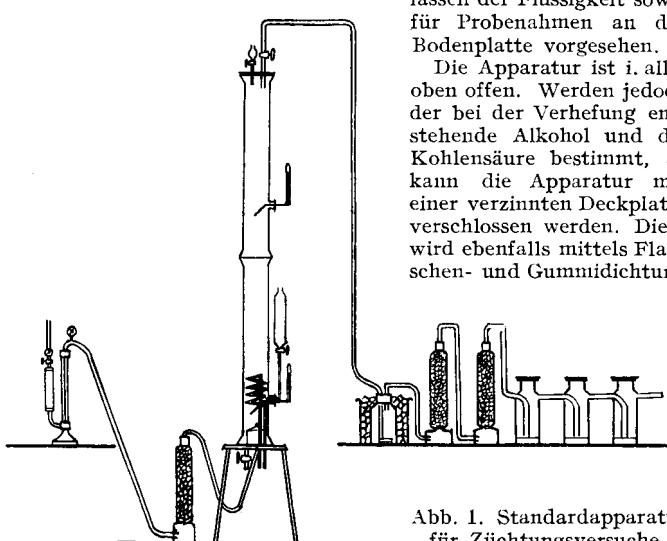


Abb. 1. Standardapparatur für Züchtungsversuche.

¹³⁾ Diss. R. Illig, Universität Berlin 1940, unveröffentlicht.

¹⁴⁾ Bei gewissen Sulfitsblaugen, die Zinn angreifen, haben sich einbrennbarer Kunstharz überzüge bewährt.

gasdicht befestigt und trägt das Gasaustrittsrohr und außerdem einen Tubus, in den ein für den Zulauf der Nährstoffe bestimmter Tropftrichter mittels Gummistopfen oder Stopfbuchse eingesetzt werden kann. Die gelösten Nährsalze müssen mittels Gegendruck eingeführt werden, wenn der Apparatur Wasch- und Absorptionsgefäß nachgeschaltet sind. Ein dritter Tubus dient zum Eintropfen von Gärkett zur Schaumbekämpfung. Die das Züchtungsgefäß verlassenden Gäräste können einer Batterie von Absorptionsgefäßen zugeführt werden, in denen Alkohol und andere flüchtige Verbindungen und die gebildete Kohlensäure aufgenommen und analytisch bestimmt werden. Die Gaswäsche zur Erfassung des Alkohols besteht aus einer in Eis gepackten Waschflasche für 2 l Fassung mit doppelt durchbohrtem Gummistopfen. Die Gäräste treten aus einer feinporigen Glasfritte in die Waschflasche aus. Nach dem Verlassen der Alkoholwäsche werden die Gase zwecks Trocknung durch zwei Chlorcalciumtürme und schließlich durch zwei mit 35%iger Kalilauge und eine dritte mit konz. Schwefelsäure beschickte Waschflasche mit gesintertem Einsatz geleitet. Der Gewichtszunahme der Waschflaschenbatterie entspricht die während des Versuchs gebildete Kohlensäuremenge.

Die Luft zur Speisung der Belüftungskörper wird zweckmäßig durch einen kleinen Laboratoriumskompressor erzeugt. Der notwendige Überdruck richtet sich nach der Art des angewandten Luftverteilers und der Höhe der Flüssigkeitssäule, meistens genügen 0,3—0,5 atü. Die Luft gelangt zunächst durch einen Wattefilter und durchströmt dann einen Luftmesser (Rotameter), ehe sie in die Belüftungsvorrichtung eintritt. Falls die bei der Verhefung gebildete Kohlensäure bestimmt werden soll, muß die zugeführte Luft zur Entfernung der Kohlensäure durch einen Turm mit schwach angefeuchtetem Natronkalk geschickt werden. Die Regulierung der Luftzufuhr geschieht durch einen sog. Feinregulierungshahn mit Mikrometerschraube. Dieser sowie Luftmesser, Luftverteiler und Absorptionsgefäß sind dem je Stunde benötigten Luftdurchgang in ihrer Leistung bzw. ihren Dimensionen anzupassen.

Wichtig ist die richtige Behandlung der Belüftungskörper aus porösem, keramischem Material. Um deren Vollsaugen zu vermeiden, was Verkleinerung des wirksamen Porendurchmessers und Erhöhung des Widerstandes bedeuten würde, darf die Apparatur grundsätzlich nur dann mit Flüssigkeit gefüllt werden, wenn zuvor die Luft angestellt worden ist. Auch nach Ablassen der Gärflüssigkeit muß noch Luft durch die Kerzen strömen. Für die Reinigung und Sterilisierung verwendet man einen Aluminiumstutzen von gleichem Durchmesser wie die Glaszyliner, jedoch nur etwa 70 cm hoch, der mittels seines umgebördelten Randes auf die Grundplatte aufgeschraubt werden kann. Am Ende eines jeden Versuchs wird dieser statt des Glaszyliners angebracht und bei noch strömender Luft zunächst mit kaltem und dann noch zweimal mit heißem Wasser gefüllt. Schließlich wird nach Ablassen des Waschwassers so lange Luft durch die Kerze geblasen, bis sie vollkommen trocken ist. So behandelte Belüftungskörper können sehr lange in Gebrauch bleiben und gewährleisten gut reproduzierbare Belüftungsverhältnisse.

Die ganze Apparatur befindet sich auf einem Ringgestell mit Dreifuß. Die Glasröhren sind mittels Schellen zu befestigen.

Arbeitsweise.

1. Herführung der Aussaathefe.

Die Stellhefe für die Standardzüchtungen wird jeweils am Vortage in einer verhältnismäßig einfachen Züchtungsapparatur unter stets gleichen Bedingungen gezüchtet. Für diese sog. Vorrüchtung der Aussaathefe dient zweckmäßig als Züchtungsgefäß ein zylindrischer, 35 cm hoher Glasstutzen mit einem Inhalt von etwa 3 l. Als Belüftungskörper werden gebrannte Steine verwendet, die eine mittelfeine Belüftung ermöglichen. Die benötigte Preßluft wird zwecks Reinigung durch einen Wattefilter geleitet. Zur Temperaturregelung steht das Züchtungsgefäß in einem Thermostaten. Verhefungsubstrat ist hierbei z. B. eine, auf reduzierenden Zucker bezogene, etwa 2%ige Holzzuckerlösung, welche mit Kreide neutralisiert und dann filtriert wird, wonach die erforderlichen Nährsalze, auf 40 g anzuwendenden reduzierenden Zucker: 2,0 g Diammoniumphosphat, 1,6 g Ammoniumsulfat, 0,9 g Kaliumsulfat und 0,5 g Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) zugefügt werden und nochmals filtriert wird. 12,0 g abgepreßte *Torula utilis* (Wassergehalt rd. 75%) dient als Aussaathefe. Zu Beginn der Züchtung werden ein weiteres Gramm Diammoniumphosphat, etwa $\frac{1}{5}$ der Nährlösung und etwa 300 cm³ Wasser in den Stutzen vorgelegt. In der ersten Stunde der Angärung werden etwa 40 l Luft je Stunde durchgeleitet. Die Züchtungstemperatur beträgt im Durchschnitt 30°. Während der Zeit der Hauptverhefung wird mit 150—180 l Luft je Stunde gelüftet. Das Substrat ist schwach sauer zu halten, die gebildete Säure durch verd. Ammoniak, insgesamt entsprechend 0,7 g Stickstoff bzw. Soda, abzustumpfen. Der Zulauf der restlichen Nährlösung erfolgt innerhalb von 6 h halbstündlich, schubweise in gestaffelten Mengen. Die Züchtungsdauer beträgt insgesamt meist 8 h. Während der letzten Stunde der „Auseifung“ wird abermals mit nur etwa 80 l Luft je Stunde belüftet. Neuerdings werden vom Anfang bis Ende der Züchtung gleichmäßig 100 l Luft pro h gegeben, wobei sich die Züchtungsdauer um 1—2 h verringert. Nach

Beendigung der Züchtung wird die Hefe durch Abschleudern auf einer Becherzentrifuge (etwa 4000 Umdrehungen) von der vergorenen Würze getrennt, aufgeschlemmt, möglichst fest abgenutscht und bis zu ihrer Verwendung im Eisschrank aufbewahrt. Die so hergeführte Hefe dient als Aussaat für den jeweils 24 h später folgenden Hauptversuch in der Standardapparatur.

2. Züchtung in der Standardapparatur.

Vor Bestimmung der Hefeertragbarkeit technischer Nährsubstrate sollen zur Prüfung der Wirkungsweise der gesamten Apparatur einige Verhefungen in reiner Glucoselösung (Standardversuche) durchgeführt werden. Die Arbeitsweise mit technischen Hefenährlösungen ist im Prinzip dieselbe wie mit Glucose.

Bei den Standardversuchen mit Glucose wird in etwa 1%iger Zuckerslösung gezüchtet. Angewandt wird eine genau abgewogene, etwa 70 g betragende Menge Glucose, welche zusammen mit den Nährsalzen, bestehend aus: 2,600 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,300 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,00 g K_2SO_4 und 1,50 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, in 5 l Leitungswasser gelöst wird¹⁵). Zusätze von Hefefaschenauszügen zum Einbringen von Spurenelementen erwiesen sich nicht als notwendig. Sämtliche für die Lüftungsversuche verwendeten Salze bzw. Lösungen sind vom Reinheitsgrad „zur Analyse“. Als Aussaathefe wurden 22 g frische, am Vortage in der beschriebenen Vorzüchtung herangezüchtete *Torula utilis* verwendet. Zu Beginn der Züchtung werden 1500 cm³ Leitungswasser sowie weitere 1,300 g Diammoniumphosphat vorgelegt und, nach Zugabe der in wenig Wasser aufgeschlemmten Stellhefemenge, 500 cm³ der Zuckernährsalzlösung zulaufen gelassen. In der ersten Stunde der Anzüchtung und der letzten halben Stunde der Ausreifung wird mit etwa 50 l Luft je Stunde belüftet. Die Anstelltemperatur beträgt 31—32° und wird in der übrigen Versuchszeit konstant bei 30° gehalten. Während der Hauptzüchtung wird dann mit 100—120 l Luft je Stunde belüftet. Der Säuregrad wird durch Zugabe einer 1,7 g Stickstoff entsprechenden Menge stark verdünnten Ammoniaks reguliert. Der Zulauf erfolgt, nach Ablauf der ersten Stunde beginnend, innerhalb von 6 h halbstündig, schubweise in gleichen Mengen. Die Züchtungsdauer beträgt insgesamt 8 h. Das pH ist zwischen 3,5 und 5 und der Säuregrad zwischen 0,08 und 0,20 zu halten.

Nach Beendigung der Züchtung wird die verheftete Flüssigkeit durch den Ablaufhahn in der Grundplatte abgelassen und sofort aufgearbeitet. Das Volumen der Hefesuspension wird dann genau bestimmt; zur Ausbeuteermittlung werden 3 l der ständig gut durchzumischende Flüssigkeit abgetrennt und auf der vorher beschriebenen Becherzentrifuge (4 Becher aus V2A-Stahl mit je 250 cm³ Inhalt) abgeschleudert. Die Hefe wird sodann mit Wasser aufgeschlemmt, quantitativ auf eine Nutsche gebracht, bis auf einen Wassergehalt von 74—76% trocken gesaugt und hiervon anschließend Trockensubstanz-, Asche- und Eiweißgehalt bestimmt.

Die abgeschleuderte hefefreie, vergorene Flüssigkeit kann zur Bestimmung des Gehalts an Restzucker und Gesamtstickstoff, Alkohol usw. verwendet werden.

Wird bei der Standardzüchtung von Glucose die erreichbare Höchstausbeute von 50—52% Hefetrockensubstanz, auf angewandte Glucose bezogen, gefunden, dann kann zur Verhefung der zu untersuchenden technischen Nährlösung geschritten werden.

¹⁵) Die Anwendung einer 70 g Glucose bzw. deren C-Gehalt entsprechenden Menge hat sich bei Gebrauch der Standardapparatur als durchweg günstig erwiesen. Selbstverständlich kann man auch, wenn es angebracht erscheint, mehr anwenden. Das Verhältnis der Nährsalzmengen zum angewandten Zucker, die entsprechende Wasserverdünnung usw. wird dann jedoch beibehalten.

Dabei sind die für den Standardversuch festgelegten Bedingungen sinngemäß der Eigenart des zu verhefenden Substrates anzupassen, bis das Ausbeuteoptimum erreicht ist. Dies kann i. allg. mittels einiger weniger Hefezüchtungen erzielt werden. So sind die anzuwendende Menge und der Verdünnungsgrad der Untersuchungslösung darauf einzustellen, daß bei der Züchtung etwa die gleiche Hefemenge zuwächst wie beim Standardversuch mit Glucose, d. h. etwa 35 g Hefetrockensubstanz. U. U. ist diese Menge durch einen Vorversuch zu ermitteln. Da sich der Begriff der Hefeertragbarkeit auf die Kohlenstoffquelle der Nährlösung bezieht, ist darauf zu achten, daß die übrigen Nährstoffe (Stickstoff, Phosphor usw.) im Überschuß vorhanden sind.

Je nach Art der Hefenährlösung ist diese noch vorzubereiten. So müssen Holzzuckerlösungen neutralisiert, Sulfitablaage gelüftet und neutralisiert werden usw. Die richtige Vorbehandlung der Nährlösung ist in vielen Fällen ausschlaggebend für den Grad der Hefeertragbarkeit.

In dem anzuwendenden Nährsubstrat werden nun wie bei der Standardzüchtung in Glucose die Nährsalze gelöst; falls die Nährsubstratmenge unter 5 l beträgt, wird mit Wasser auf 5 l aufgefüllt und die Züchtung nach Standardvorschrift durchgeführt. U. U. auftretende Schaumentwicklung ist durch Zusatz von möglichst wenig Gärfeft zu verhindern.

Der erhaltene Hefetrockensubstanzzuwachs wird auf eine bestimmte Menge der untersuchten Hefenährlösung, z. B. auf 1 l oder bei sirupartigem Ausgangsmaterial auf 1 kg, oder aber auf Trockensubstanz sinngemäß umgerechnet und stellt die Hefeertragbarkeit der betreffenden Nährlösung dar.

Die Brauchbarkeit der Standardapparatur und der Arbeitsweise hat sich sowohl in einschlägigen Laboratorien als auch in der Industrie in allen Fällen erwiesen.

Herrn Dr. Hugo Koch sowie Herrn Dr. Strathmeyer von der Deutschen Bergin A.-G., Mannheim-Rheinau, wurde im Sommer 1938 als ersten Gelegenheit gegeben, sich in unserem Laboratorium in die Methodik der Standardverhefung und der Futterhefenzüchtung einzuarbeiten. In der eigenen, durch unsere Glasbläserei beschafften Apparatur konnte die genannte Firma wichtige Aufgaben erfolgreich durchführen. Inzwischen ist die Apparatur u. a. von Dr. H. Scholler, von der Wirtschaftl. Vereinigung der dtsh. Hefeindustrie, von der Süddtsch. Holzverzuckerungs-A.-G., Regensburg, von der I. G. Farbenindustrie A.-G., Werk Wolfen, von der Phrix-G. m. b. H., Hirschberg, und zahlreichen anderen Laboratorien beschafft und die Arbeitsweise zur Lösung aller möglichen Fragestellungen verwendet worden. Besonders aber in unserem Laboratorium sind außer Hunderten von Hefezüchtungen mit theoretischer Fragestellung, insbes. zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der biologischen Eiweißsynthese, viele Dutzende neuer und alter Substrate, die für die Verhefung als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle in Frage kommen, auf ihre Eignung zur Hefegewinnung untersucht worden, wobei es meistens auf die Ermittlung der „Hefeertragbarkeit“, also der jeweiligen Höchstausbeute ankam.

Wir nennen nur die Holzhydrolysat, gewonnen nach den inzwischen schon ziemlich zahlreich gewordenen Holzverzuckerungs- und Zellstoffverfahren, die bei der Vergärung verschiedener Rohstoffe anfallenden Industrieschleim, Pülphydrolysat, Abwässer der Faserpflanzenröste, Fischpreßwässer u. a. m.

Eingeg. 31. März 1941. [A. 24.]

Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiete der Verwertung der Sulfitablaage

Von Dr. phil. EDUARD VON DRATHEN und Dr. rer. nat. HANS WALTHER

Laboratorium der Chemischen Fabrik Coswig-Anhalt H. Schraube

Bei dem großen Anfall des Lignins beim Holzaufschluß sind die großen Mengen bislang nicht verwertbarer Substanzen so aufzuarbeiten, daß sie als wertvolle Rohstoffe der Wirtschaft zugeführt werden können. Da dies nicht bei allen daraus gewonnenen Produkten der Fall ist, wurden im hiesigen Laboratorium erneut Untersuchungen über die Verwendungsmöglichkeiten der Ligninsulfosäure sowie die konstitutionellen Probleme angestellt.

Schon die technische Sulfitablaage stellt ja hinsichtlich Einheitlichkeit ein Problem dar. So erhielten M. Honig u. I. Spitzer bzw. Melander, Klason, Dorée u. Hall bei der Umsetzung mit Ba-Salzen Produkte, deren Bariumgehalt zwischen 9,20% und 11,56% Barium schwankte, obwohl sie von einem angeblich einheitlichen Ausgangsmaterial — Fichtenholz — ausgegangen waren. Sie nahmen daher an, daß entweder verschiedene Ligninsulfosäuren bestünden oder die eine oder andere Reaktion von der Sulfosäure nicht ohne Abbau vertragen würde. Der Summenformel von Klason, $\text{C}_{13}\text{H}_{50}\text{O}_{18}\text{S}_2\text{Ba}$,

steht die Sulfosäure von Dorée u. Hall, $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{12}\text{S}$, gegenüber. Bei vorsichtiger Schätzung kann ein Molekulargewicht des Grundmoleküls mit 750—760 angenommen werden, so daß die Sulfosäuren um den entsprechenden Betrag höher liegen. Allerdings ist es bis jetzt noch in keiner Weise gelungen, eine eindeutige Formulierung des ganzen Molekülverbandes zu reproduzieren, da die üblichen Umbau- und Abbauprodukte sowie die ebulloskopischen wie kryoskopischen Messungen zu weit differierenden Ergebnissen führen. Reaktionen im alkalischen Medium führen zu Umsetzungsprodukten, die durch Auftreten neuer saurer Gruppen gekennzeichnet sind und die u. U. als Ausgangspunkt umfangreicher Studien dienen könnten.

Bei der Benzoylierung nach Schotten-Baumann wirkt das Alkali auf die Ligninsulfosäure hydrolytisch ein, so daß unter diesem Gesichtspunkt erst eine OH-Gruppe gebildet wird, die vorher überhaupt nicht vorhanden war. Bei der Einwirkung von Dimethylsulfat steigt der Methoxylgehalt durch mehrmalige Methylierung fast auf das Doppelte.