

Bei diesen Versuchen wurde gleichzeitig die Beobachtung gemacht, daß die Lactico-dehydrase der Bakterien (genau wie die Formico-¹⁶⁾ und die Succino-dehydrase) im Gegensatz zu Angaben Yudkins¹⁷⁾ keines dialysablen Co-Ferments bedarf; dies unterscheidet sie vom tierischen Enzym und stellt sie an die Seite des Hefeferments¹⁸⁾.

III. Untersuchungen an Autolysaten gefrorener Bakterien.

Wenn sich auch die Friersaferherstellung grundsätzlich zur Isolierung von Bakteriendehydrasen geeignet erwiesen hat, so stellt sie doch ein sehr verlustreiches Verfahren dar; selbst von der gut löslichen (s. später) Lactico-dehydrase gehen nur einige wenige Prozent der ursprünglich in den Zellen vorhandenen Enzymmenge in Lösung. (Indes ist zu bedenken, daß auch das Buchnersche Preßsaftverfahren bei Pilzen nur Ausbeuten von einigen Prozent liefert¹⁹⁾). Es wurden daher die zentrifugierten Zellrückstände der Friersaferdarstellung bei pH 7,5 und 37° einer 10—20tägigen Autolyse (ohne weitere Zusätze) unterworfen. Alle Dehydrasen, auf die in den Friersäften mit Erfolg geprüft worden war, fanden sich auch in den zentrifugierten zellfreien Autolysaten, doch mit einer — von Succino- und Glutamino-dehydrase abgesehen — höheren spezifischen Aktivität (= Aktivität/Trockengewicht) als in den Friersäften.

a) So wurden in einem dem Versuch IIb vollkommen entsprechenden Ansatz mit 1 cm³ Coli-Autolysat (= 10 mg Tr.-Gew.) folgende Entfärbungszeiten (in Minuten) beobachtet:

ohne Donator	100	mit Succinat	53
mit Lactat	1,5	mit Glucose	28
mit Glutaminat	13,5	mit Formiat	28
mit Malat	8		

¹⁶⁾ E. F. Gale, ebenda **33**, 1012 [1930].

¹⁷⁾ J. Yudkin, ebenda **31**, 865 [1937].

¹⁸⁾ E. u. M. E. Boyland, ebenda **23**, 1417 [1934]; E. Adler u. Michaelis, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **235**, 154 [1935].

¹⁹⁾ Vgl. z. B. A. Harden: Alcoholic fermentation, S. 30 [London 1923]; W. Franke u. Deffner, Liebigs Ann. Chem. **541**, 117 [1939].

Vor allem war die Enzymausbeute wegen des gleichzeitig mehrfach höheren Trockengewichts der Autolysate durchweg wesentlich besser als in den Friersäften; rd. ein Viertel der Ausgangsmenge an Lactico-dehydrase, ein Siebtel derjenigen von Formico-dehydrase (doch nur wenige Prozent der in der Zelle vorhandenen Succino-dehydrase, die — ebenso wie die Glutamino-dehydrase — während der Autolyse offenbar eine Schädigung erfährt), wurden in den Autolyselösungen wiedergefunden.

Die Autolyse intakter Bakterien wies gegenüber derjenigen gefrorener Zellen verschiedene Nachteile auf (z. B. große Zähflüssigkeit und dementsprechend schwere Zentrifugierbarkeit der Autolysate) und ließ nicht die mit letzteren erzielten guten Ausbeuten erreichen.

IV. Lösungszustand der isolierten Dehydrasen.

Nach Filtration der auf die eine oder andere Art gewonnenen Enzymlösungen durch bakteriendichte Filter (1 μ Porenweite) findet man die Formico-dehydrase nicht mehr, die Lactico-dehydrase vollständig, die übrigen Dehydrasen teilweise (zu $\frac{2}{5}$ — $\frac{2}{3}$) im Filtrat wieder. Mit Ausnahme der Formico-dehydrase, für die schon Stickland²⁰⁾ u. Gale²¹⁾ zu gleichen Befunden gelangt waren, handelt es sich bei den isolierten Bakteriendehydrasen also um grundsätzlich „lösliche“ Enzyme (in dem in der Enzymchemie gebräuchlichen Sinne).

Dieses Ergebnis ist überraschend für die erstmals aus Bakterien isolierte Succino-dehydrase, da ein analoger Filtrationsversuch an einer aus Pferdeherz (nach Thunberg²²⁾) dargestellten Succinodehydraselösung einen rd. 90%igen Aktivitätsverlust ergab.

Nach den vorliegenden Ergebnissen, über die an anderer Stelle ausführlicher berichtet wird²³⁾, scheinen sich die beiden Verfahren der Friersafer- und Autolysaferherstellung aus gefrorenen Zellen allgemein für die Isolierung von Desmolasen aus Bakterien (und wohl auch anderen Mikroorganismen) zu eignen und sollen in dieser Richtung weiter geprüft und ausgebaut werden.

Eingeg. 15. März 1940. [A. 30.]

²⁰⁾ T. Thunberg bei Oppenheimer-Pincussen: Die Methodik d. Fermente, S. 112b [Leipzig 1929].

²¹⁾ W. Franke u. B. Banerjee, Biochem. Z. im Druck.

Über die Verhefung der Pentosen*)

Von Dr.-Ing. habil. RICHARD LECHNER,

Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Berlin

Unter den Kohlenhydraten nehmen die Pentosen, die Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen, einen untergeordneten Platz ein. Sie gelten als unvergärbare und sind damit gärungschemisch gegenüber den Hexosen als Kohlenhydrate zweiten Ranges gekennzeichnet. Auch ihre Ausnützung im tierischen Organismus ist schlechter als die der Hexosen. Die Pentosen sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen meist in polymerer Form als Pentosane vor und sind vornehmlich am Aufbau der Hemicellulosen beteiligt. Vor allem weisen Holz und Stroh und die Samen und Schalen vieler Pflanzen einen beträchtlichen Pentosengehalt auf. So enthält Fichtenholz oder Kiefernholz durchschnittlich 12—13%, Buchenholz sogar 28—30% Pentosane. Die Angaben über die Pentosangehalte der Hölzer schwanken und sind nicht einheitlich. Der auffallende Unterschied im Pentosangehalt von Nadel- und Laubholz beruht auf der grundverschiedenen Zusammensetzung des Hemicellulosenanteils der beiden Holzarten. Die größte Bedeutung unter den Pentosen hat die d-Xylose, die im Holz fast ausschließlich vorkommt. Von geringerem Interesse sind die l-Arabinose, die Methylpentose Rhamnose und die mit den Pentosen in enger Beziehung stehenden Hexuronsäuren.

Bei der chemischen Verarbeitung des Holzes zur Zellstoff- und Papierherstellung und bei der Hydrolyse des Holzes mit Säuren finden sich in den Sulfitablaugen und Holzzuckerlösungen die Pentosen mehr oder minder vollständig und unersetzt wieder. Der Verwertung der Pentosen kommt vom Standpunkt der Rohstoffausnutzung und in wirtschaftlicher Hinsicht eine gewisse Bedeutung zu. Infolge der zunehmenden chemischen Verarbeitung von Holz auf Papier und Zellstoff

kann der Rohstoffbedarf in Verbindung mit der deutschen Eigenversorgung nicht mehr wie früher ausschließlich durch Nadelholz gedeckt werden, sondern es muß auch auf das sehr pentosanreiche Laubholz, insbes. Buchenholz, zurückgegriffen werden. Die teilweise Umstellung der Zellstoffindustrie auf den Rohstoff Buchenholz hat einen vermehrten Anfall sehr pentosenreicher Abflaugen zur Folge. Die Verwertung der Buchenholzsulfitablaugen stellt die Zellstoffindustrie vor neue Aufgaben. Die Ausnutzung des Kohlenhydratanteils der Buchenholzsulfitablaugen ist ein Problem der Pentosenverwertung geworden. Da die Konzentration der Pentosen in Holzzuckerlösungen und Sulfitablaugen verhältnismäßig gering ist und eine Reihe teils bekannter, teils undefinierter Begleitstoffe zugegen ist, ist die chemische Verarbeitung der Pentosen zu Furfurol oder die Gewinnung der Pentosen in fester oder reiner Form als Futtermittel, Diabetikernahrung usw., abgesehen von der Wirtschaftlichkeit, mit Schwierigkeiten verbunden. Die gärungschemische Verwertung der Pentosen ist dadurch in den Vordergrund gerückt und zum Teil bereits gelöst worden.

Bei der gärungschemischen Verwertung von Zuckern oder anderen geeigneten Kohlenstoffverbindungen sind grundsätzlich zwei Wege zu unterscheiden. Erstens „Vergärung“ irgendwelcher Stoffe, d. h. ihre Aufspaltung in ein, zwei oder mehrere Gärungsprodukte, wie Alkohol, Kohlensäure, Essigsäure usw., mit Hilfe von Mikroorganismen, welche diesen Vorgang mit ihren Enzymsystemen unter geeigneten Bedingungen auslösen, also gewissermaßen katalysieren, und zweitens die „Zellsubstanzbildung“, indem die den Mikroorganismen dargebotenen Kohlenstoffverbindungen bei Nährsalz- und Luftzuführung zum Aufbau neuer Zellsubstanz

*) Nach einem für die 52. Hauptversammlung des VDOh in Salzburg vorgesehenen Vortrag.

Verwendung finden. Die beiden Wege verlaufen nie hundertprozentig in der einen oder anderen Richtung, d. h. mit anderen Worten, Gärung und Zellsubstanzsynthese sind nie völlig voneinander zu trennen. Die Zellsubstanzsynthese durch Mikroorganismen führt auch die allgemeine Bezeichnung „biologische Rohstoffsynthese“, und in den besonderen Fällen, wenn es sich um die Bildung von besonders fett- oder eiweißreicher Zellmasse handelt, spricht man von biologischer Fett- bzw. Eiweißsynthese. Für die Zellsubstanzsynthese durch Hefen hat sich die Bezeichnung „Verhefung“ eingebürgert.

Für die gärungsschemische Verwertung der Pentosen schien von den beiden Möglichkeiten der Vergärung und der Zellsubstanzsynthese die letztere im Hinblick auf eine technische Verwirklichung die aussichtsreichste. Der Mangel an Eiweißkraftfuttermittel in Deutschland hatte dem seit dem Weltkrieg ruhenden Problem der Eiweißsynthese auf biologischem Wege neuen Auftrieb gegeben. So waren in den letzten Jahren auf diesem Gebiet große Fortschritte erzielt und Erfahrungen gesammelt worden. Als Kohlenstoffquellen fanden Hexosen und einfache Kohlenstoffverbindungen und Zwischenprodukte des Kohlenhydratabbaues und als technische Nährsubstrate in erster Linie Holzzuckerlösungen und Nadelholzsulfitablaugen Verwendung (1). Die Verwertung der Pentosen zur Erzeugung eiweißreicher Zellmasse für Futterzwecke war den nachstehenden Untersuchungen als Ziel gesetzt worden.

Nach den spärlichen in der Literatur verzeichneten Angaben ist das Verhalten der Mikroorganismen gegenüber Pentosen bislang wenig studiert worden. Allgemein wurden die Pentosen als sehr widerstandsfähig gegenüber dem Angriff von Mikroorganismen angesehen. Was die Bildung von Gärprodukten bei der Einwirkung von Mikroorganismen anbelangt, so ist bekannt, daß Schimmelpilze Pentosen angreifen; die Gärprodukte, vielfach aus Gemischen, insbes. organischen Säuren, bestehend, sind nicht immer genau bekannt. Ähnlich ist das Verhalten der Bakterien gegenüber Pentosen. Hefen vergären die Pentosen nicht. Die Alkoholbildung aus Pentosen durch Hefen war lange unstritten, jedoch bei Schimmelpilzen, z. B. *Fusarium lini* Bolley, einwandfrei nachgewiesen (2). Über die Ausnutzung der Pentosen zum Zellaufbau von Mikroorganismen bestanden nur wenige allgemeine Angaben. Es waren keinerlei gesicherte Grundlagen vorhanden, auf die weiter aufgebaut werden konnte.

Um zunächst einen Überblick zu gewinnen, wurde eine große Reihe von Mikroorganismen aus der Sammlung des Instituts für Gärungsgewerbe auf ihre Fähigkeit, Pentosen, u. zw. in erster Linie Xylose, zu verwerten, untersucht. Da die Prüfung sich auf die Eignung zur Zellsubstanzsynthese beschränkte, wurden nur Hefen und Schimmelpilze in den Kreis der Betrachtung gezogen. Desgleichen war die Natur der entstandenen Gärprodukte ohne Interesse. Die Auswahl der Mikroorganismen entbehrte bei der vorhandenen Vielzahl nicht einer gewissen Willkür, obwohl nach Möglichkeit alle Arten und Gattungen Berücksichtigung fanden. Die Untersuchung von nahezu 70 Organismen im Kulturkölbchen mit ruhender Oberfläche (im Gegensatz zur Züchtung unter Luftzufuhr in bewegter Nährflüssigkeit) ergab, daß sehr viele Mikroorganismen Xylose anzugreifen vermögen. An der Spitze standen die verschiedenen Schimmelpilzarten, die bis auf wenige Ausnahmen Xylose abbauten und sich in der nur Xylose als Kohlenhydratquelle enthaltenden Nährlösung vermehrten. Im Gegensatz dazu zeigten die Hefen meistens nur eine ganz geringe Entwicklung. Bierhefen, Weinhefen und einige andere vermehrten sich nicht oder kaum, wenngleich ein geringer Xyloreschwund in der Nährlösung festzustellen war. Kahlhefen entwickelten sich besser. Sehr unterschiedlich war das Verhalten der Torulahefen. Einige bauten die dargebotene Xylose vollständig ab, andere wuchsen in Xylose nicht oder kaum. Die allgemein zur biologischen Eiweißsynthese verwendete *Torula utilis* vermehrte sich auch nur in geringem Maße. Ähnlich wie die nur auf ruhenden Oberflächen wachsenden Schimmelpilze vermögen die zwischen Hefen und Schimmelpilzen stehenden Moniliaarten, die sowohl eine Mycelhaut an der Oberfläche als auch innerhalb der Nährflüssigkeit hefeähnliche Zellen bilden, Xylose anzugreifen und zum Aufbau eigener Zellmasse zu verwenden. Es ist noch darauf hinzuweisen, daß vielfach ein Xyloreschwund eingetreten

war, ohne daß ein entsprechender Gärvorgang oder ein Wachstum der betreffenden Mikroorganismen festgestellt werden konnte. Durch Zusatz bioshaltiger Stoffe wurde lediglich der Xyloseabbau durch Mikroorganismen beschleunigt, aber keineswegs die Unfähigkeit, Pentosen zu verwerten, aufgehoben. Mikroorganismen, die im Kulturkölbchen Xylose angriffen, vermochten nicht immer auch andere Pentosen, z. B. Arabinose, abzubauen.

Auf Grund weiterer Vorversuche mit Lüftung der Nährlösung wurden zwei Mikroorganismen ausgewählt. Mit *Torula utilis*, die sich bisher bei der Verhefung von Hexosen bestens bewährt hatte, und *Monilia candida*, die sich bei den Vorversuchen durch starkes Wachstum in Pentosen auszeichnete, wurden eingehende Untersuchungen angestellt. Schimmelpilze, also Organismen, die zum Wachstum einer ruhenden Oberfläche bedürfen, schieden von vornherein aus, da ihre technische Verwendung wegen der benötigten riesigen Oberflächen aus Gründen der Materialbeschaffung und der Wirtschaftlichkeit untragbar erschien. Nur im Lüftungsverfahren zu züchtende Organismen, also Hefen, kamen für eine spätere technische Anwendung überhaupt in Frage. *Monilia candida* bildet außer Mycel auch hefeartige Zellen, deren Vermehrung bei Lüftung unter der Oberfläche studiert wurde.

Die Züchtung von *Torula utilis* verlief zunächst erfolglos. Es trat kein Zuwachs an Hefe ein, obwohl nach der Lüftung ein Teil der angewandten Xylose nicht mehr nachzuweisen war. Erst im Oktober 1938 gelang dann überraschend die Verhefung von Xylose durch *Torula utilis* im Lüftungsverfahren (3). Entgegen allen früheren Befunden sproßte die Hefe in der gelüfteten Xylosenährlösung und vermehrte sich lebhaft. Die Verhefung von Xylose durch *Torula utilis* stieß dann weiterhin auf keine Schwierigkeiten mehr. Die Ursache des nun positiven Verhaltens der *Torula utilis* konnte nicht aufgeklärt werden und wurde auf unbekannte Einflüsse zurückgeführt. Weder stimulierend wirkende Beimengungen in der Xylose oder im Holzzucker noch die verschiedene Herkunft und Vorgeschichte der Stellhefe oder eine allmähliche Anpassung der *Torula utilis* an das xylosehaltige Nährsubstrat erklärten nach den ausgeführten Untersuchungen das plötzliche Vermögen der *Torula utilis*, Xylose zum Zellaufbau zu verwerten. Zur Erreichung höchster Ausbeuten bei der Verhefung von Xylose bedurfte die Hefe in manchen Fällen einer gewissen Angewöhnung. Die Art der Herführung und der physiologische Zustand der *Torula utilis* waren für den Grad der Pentosenausnutzung von Einfluß. Die Dauerzüchtung der *Torula utilis* in Xylose mit nur anorganischem Stickstoff war möglich. Bei der Dauerzüchtung wurde jeweils ein Teil der Erntehefe des vorhergehenden Versuchs zum Anstellen des nächsten verwendet. Ein Abfall in der Ausbeute trat bei der laufenden Fortführung der Hefe nicht ein. Desgleichen konnte die Hefe frei von Infektionen gehalten werden. Ein Unterschied zwischen der Verhefung von Xylose und Glucose bestand in der geringeren Vermehrungsgeschwindigkeit der *Torula utilis* in Xylose und in der dadurch bedingten längeren Lüftungsdauer. Die aus Xylose erhaltenen Hefeaussbeuten bewegten sich zwischen 46 und 49% und waren damit ähnlich denen aus Glucose. Dagegen war der Rohproteingehalt der Xylosehefen i. allg. niedriger und bewegte sich durchschnittlich zwischen 40 und 50% in der Trockensubstanz; manchmal lag er sogar unter 40%. Dementsprechend waren auch die Rohproteinaussbeuten niedriger als bei Glucose. Es war auffallend, daß bei allen Züchtungen 3–5% der angewandten Xylose unausgenutzt blieben. Die bei Verhefung von Glucose anzuwendenden optimalen Züchtungsbedingungen, wie Stellhefemenge, Temperatur usw., erwiesen sich auch für die Verhefung von Xylose günstig.

Über den Reaktionsverlauf beim Xyloseabbau und die Zwischenstufen bei der Verhefung von Xylose liegen nur spärliche Angaben vor. Eine Gärungsgleichung analog der Gay-Lussacschen Gleichung für Hexosen existiert nicht. Auf Grund von Kohlenstoffbilanzen und Kohlensäurebestimmungen bei der Züchtung von *Torula utilis* und *Monilia candida* in Xylose und unter Berücksichtigung der Verhältnisse mit Glucose wurde es wahrscheinlich gemacht, daß die Xylose derart zerlegt wird, daß zwei Kohlenstoffatome in Form von Kohlendioxyd abgespalten werden und der übrige Kohlenstoff

zur Zellsynthese verfügbar ist. Durch Veratmung und Nebenreaktionen geht allerdings noch ein Teil dieses Kohlenstoffs verloren. Es gelang nicht, Acetaldehyd abzufangen. Die Untersuchungen über den Mechanismus des Xyloseabbaus sind noch im Gange.

Bei der Verhefung von Xylose mit *Torula utilis* konnte eine Veränderung der Zellform der *Torula utilis* festgestellt werden. Die Veränderung betraf aber nur immer einen Teil der Hefezellen und schwankte anteilmäßig in weiten Grenzen. Abweichend von den charakteristischen ovalen kleinen Zellen bildeten sich bei der Lüftung in Xylose runde Zellen verschiedener Größe. Sehr auffallend war die Ausbildung sehr großer runder Zellen, welche die normale *Torula*-Zelle um ein Mehrfaches übertrafen. Diese Zellform war für *Torula utilis* bisher unbekannt. Die runden Zellen stellen eine umweltbedingte Zellform der *Torula utilis* dar. Von großen runden Zellen ausgehend, wurden bei Weiterzüchtung wieder normale ovale Zellen erhalten. Der niedrige Rohproteingehalt von Xylosehefen wurde in Zusammenhang gebracht mit der Ausbildung der runden Zellen, denn Hefen mit besonders hohem Anteil an runden, insbes. großen runden Zellen hatten auch einen besonders niedrigen Rohproteingehalt.

Neben Xylose, die allerdings allein technische Bedeutung besitzt, wurden vergleichsweise mit Arabinose, mit der Methylpentose Rhamnose und mit Glucuronsäure Züchtungen von *Torula utilis* im Lüftungsverfahren versucht. Die *Torula utilis* vermochte jedoch keine der drei genannten Substanzen als Kohlenstoffquellen auszunutzen. Es konnte kein Hefezuwachs erzielt werden. Die Fähigkeit zur Ausnutzung einer Pentose durch einen Mikroorganismus schließt nicht ein, daß alle Pentosen oder mit den Pentosen eng verwandte Substanzen ebenfalls verwertet werden können. Man darf streng genommen nicht allgemein von Pentosenverhefung sprechen, sondern muß die betreffende Pentose näher kennzeichnen.

Als zweiter Mikroorganismus wurde die bei den Vorversuchen hervorgetretene *Monilia candida* eingehend untersucht. *Monilia candida* vermag außer Mycel auch hefeartige Zellen zu bilden, die sich wie Hefen durch Sprossung vermehren können. Da für die Züchtung im Lüftungsverfahren keine Erfahrungen vorlagen, wurde zunächst anlehnd an die optimalen Bedingungen der *Torula utilis* gearbeitet. Es trat dabei eine Reihe von Schwierigkeiten auf, so daß die Versuche insbes. am Anfang nicht in bezug auf alle Problemstellungen befriedigende Ergebnisse brachten. Die vordringlichsten und wichtigsten Fragen konnten aber klargestellt werden. Erst nachdem in Lüftungsversuchen in Glucose und glucosehaltigen Substraten mit *Monilia candida* allgemeine und grundlegende Erfahrungen gesammelt waren, wurde die Verhefung der Xylose in Angriff genommen. Die Dauerzüchtung mit nur anorganischem Stickstoff erwies sich sowohl in Glucose als auch in Xylose als durchführbar. *Monilia candida* benötigt ebenso wie *Torula utilis* keinerlei biosartige Stoffe zum Wachstum und zur Vermehrung. *Monilia candida* ruft in Glucose auch bei intensiver Lüftung sehr leicht Alkoholgärung hervor, insbes. bei Anwendung höherer Zuckerkonzentration während der Züchtung. Die alkoholische Gärung ließ sich nicht vollkommen unterdrücken, die mit *Torula utilis* in Glucose erzielten Ausbeuten an Hefezellsubstanz wurden nicht erreicht. Die Züchtung von *Monilia candida* in Xylose ergab Ausbeuten bis 50% Hefetrockensubstanz auf verschwundene Xylose bezogen, also ähnliche Werte wie *Torula utilis*. Die Rohproteingehalte der Erntehefen bewegten sich bei *Monilia candida* in Xylose zwischen 40 und 50% und lagen ähnlich niedrig wie bei den in Xylose gezüchteten *Torula*-hefen. Noch etwas geringer als die Assimilationsgeschwindigkeit von Xylose durch *Torula utilis* ist die durch *Monilia candida*. Die vollkommene Ausnutzung der dargebotenen Xylose ist möglich.

Monilia candida zeigte beim Lüften ein anderes Bild als *Torula utilis*; sie reicherte sich vorzugsweise im Schaum an und setzte sich am Gefäßrand über dem Flüssigkeitsspiegel ab. Sie war flockig, sank nach Beendigung der Lüftung immer rasch zu Boden und bildete dort einen voluminösen Niederschlag. Übermäßiges Schäumen trat nicht auf. Im mikroskopischen Bild hatte die *Monilia candida* Ähnlichkeit mit *Torula utilis*. Sie wies kleine runde bis ovale Zellformen auf. Gegen Infektionen war sie sehr widerstandsfähig.

Die Ausnutzung der Xylose gelang mit *Torula utilis* und *Monilia candida* auch in Glucose-Xylose-Gemischen. Zudem konnte gezeigt werden, daß *Torula utilis* außer Glucose, Mannose und Xylose auch Galaktose zu verwerten vermag. Auch von *Monilia candida* wird die Galaktose zur Zellsubstanzsynthese ausgenutzt. Die Assimilationsgeschwindigkeit der einzelnen Zucker ist allerdings verschieden. Sie nimmt in der Reihenfolge Glucose, Galaktose, Xylose ab. *Torula utilis* und *Monilia candida* vermögen alle wesentlichen im Holz vorkommenden Kohlenhydrate zum Aufbau eigener Zellmasse zu verwerten. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, die Kohlenhydrate der durch Hydrolyse von Holzsubstanz erzeugten technischen Zuckerlösungen vollständig zu verhefen. Es galt nur, die der Verarbeitung jeder technischen Nährlösung entgegenstehenden besonderen Schwierigkeiten zu überwinden. In Holzzuckerlösungen ließ sich die Verhefung aller darin enthaltenen Kohlenhydrate durch *Torula utilis* und *Monilia candida* durchführen. Auch die Kohlenhydrate der Nadelholzsulfitablaugen konnten vollständig erfaßt und ausgenutzt werden. Auf den Gesamtzucker, d. h. Hexosen plus Pentosen, bezogen, wurden normale Ausbeuten von rd. 50% Hefetrockensubstanz erhalten. Wie H. Fink u. R. Lechner (4) kürzlich zeigten, wurden bei der Verhefung von Nadelholzsulfitablaugen in technischem Maßstab die Pentosen vollständig mit ausgenutzt, ohne daß eine Verlängerung der Lüftungsdauer oder andere besondere Maßnahmen erforderlich geworden waren. In Holzzucker- und Sulfit-spritschlempen, d. h. zu Alkohol vergorenen und abgebrannten Holzzuckerlösungen bzw. Sulfitablaugen, die praktisch nur noch Xylose enthielten, bereitete die Hefezüchtung ebenfalls keine Schwierigkeiten.

Die Mitverwertung der Pentosen bei der Verhefung der Kohlenhydrate der Holzzuckerlösungen und Nadelholzsulfitablaugen erfolgt ohne irgendwelche besonderen Vorkehrungen und Maßnahmen und bringt eine bessere Ausnutzung der Rohstoffe und eine Erhöhung der Wirtschaftlichkeit der Futterheferzeugung mit sich. Die anfallenden kohlenhydratfreien Nährsubstrate erleichtern zudem die Abwasserbeseitigung. Zur Gerbextrakterstellung sind zuckerfreie Sulfitablaugen besonders geeignet. Anders liegen die Verhältnisse bei der **Buchenholzsulfitablauge**. Nadelholz und Buchenholz und dementsprechend die daraus erhaltenen Sulfitablaugen weisen eine grundverschiedene Zusammensetzung ihres Kohlenhydrat-

	Nadelholzsulfitablauge	Buchenholzsulfitablauge	
		I	II
Vergärbare Zucker (Hexosen)	1,57 %	0,40 %	0,61 %
Pentosen	0,54 %	3,68 %	2,06 %

anteils auf. Bei der Nadelholzsulfitablauge überwiegt der Gehalt an vergärbarem Zucker, während umgekehrt die Kohlenhydrate der Buchenholzsulfitablaugen zum größten Teil aus Pentosen bestehen. Die Nadelholzsulfitablaugen werden technisch auf Alkohol vergoren und liefern den Sulfit-sprit. Die unvergärbaren Pentosen bleiben dabei unausgenutzt. Die Buchenholzsulfitablaugen sind, abgesehen von ihrer schädigenden Wirkung auf die Hefe, wegen ihres geringen Gehalts an vergärbarem Zucker nicht wie Nadelholzsulfitablaugen wirtschaftlich auf Alkohol zu vergären.

Durch die zunehmende Verarbeitung von Laubholz zur Zellstoffherzeugung fallen aber, wie schon erwähnt, große Mengen Buchenholzsulfitablaugen an. Die Verwertung der Buchenholzsulfitablauge ist zu einem Problem der Zellstoffindustrie geworden. Die Verhefung bietet nun die Möglichkeit, die Kohlenhydrate der Buchenholzsulfitablauge restlos zu verwerten. Die Buchenholzsulfitablauge stellt gegenwärtig das wichtigste pentosenhaltige Nährsubstrat für die Erzeugung eiweißreicher Futterhefe dar.

Die Verhefung der Kohlenhydrate der Buchenholzsulfitablauge gestaltet sich aber wesentlich schwieriger als bei der üblichen Nadelholzsulfitablauge. Dabei treten nämlich die bei der gewöhnlichen Ablauge bestehenden Schwierigkeiten in erhöhtem Maße auf. Die Neigung zu Fällungen und Ausflockungen während der Lüftung ist sehr groß. Die Anwendung wirksamer Klärungsverfahren ist daher Vorbedingung für die reibungslose Durchführung der Verhefung. Eine besonders lästige Erscheinung stellt das überaus heftige Schäumen dar.

Es bleibt noch abzuwarten, ob die Schaumschwierigkeiten, die die technische Durchführbarkeit der Hefezüchtung zum Scheitern bringen können, in Verbindung mit der Vogelbusch-Feinstbelüftung, die sich für technische Futterhefeszüchtungen in Nadelholzsulfitablaugen bestens bewährte, oder mit besonders konstruierten Verhefungsapparaturen beseitigt werden können. Außerdem besitzen die Buchenholzsulfitablaugen noch eine unangenehme Eigenschaft, die bei den Nadelholzsulfitablaugen nicht beobachtet wurde. Sie zeichnen sich nämlich durch eine gewisse Giftwirkung aus, die zu einer Schädigung bzw. bis zum Abtöten der Hefezellen führt.

Die seinerzeit bei Beginn der Versuche zur Verhefung der Buchenholzsulfitablauge erzielten Ergebnisse waren wenig ermutigend. Die anspruchslose *Torula utilis* und die *Monilia candida* vermehrten sich sehr schlecht, die höchsten Ausbeuten betrugen 14 g Hefetrockensubstanz aus 1 l Buchenholzsulfitablauge mit etwa 34–40 g Gesamtzucker. Bei den Dauerzüchtungen, die z. T. in der Standardapparatur (5) vorgenommen wurden, traten häufig Fällungen von Salzen ein, die das Wachstum der Hefe unterdrückten und die Hefe für eine Weiterzüchtung meist völlig unbrauchbar machten. Die Züchtungen verliefen auch sehr unterschiedlich und unregelmäßig. Zudem trat noch eine eigenartige Erscheinung auf. Das p_H der Nährlösung verschob sich nach der alkalischen Seite, und das optimale schwach saure p_H konnte nur durch Zugabe von manchmal ziemlich großen Mengen H_2SO_4 eingehalten werden.

Im Verlauf der Weiterführung der Versuche mit *Torula utilis* wurde dann die Klärung der Buchenholzsulfitablauge eingehend studiert. Durch Einhaltung bestimmter Bedingungen gelang es, auch die Ausbeuten bedeutend zu verbessern und die Aschegehalte der Hefen in erträglichen Grenzen zu halten. Es stellte sich heraus, daß normal vorbehandelte Buchenholzsulfitablauge Hefen- bzw. Giftstoffe enthält, die auf die Hefe, selbst auf die allgemein sehr widerstandsfähige *Torula utilis*, ungünstig einwirkten. Es gelang nicht, *Torula utilis* in unverdünnter Ablauge zu züchten. Die Buchenholzsulfitablauge mußte zur Verhefung verdünnt werden, und zwar sehr erheblich. Beim Überschreiten einer bestimmten Konzentrationsgrenze wurde das Hefewachstum gehemmt und schließlich die Hefe abgetötet. Um eine Dauerzüchtung der *Torula utilis* in Buchenholzsulfitablauge durchführen zu können, muß nach den bisherigen Erfahrungen die Buchenholzsulfitablauge mit ihrer verhältnismäßig hohen Zuckerkonzentration auf einen Gesamtzuckergehalt von etwa 1,2% verdünnt werden. Je nach der Konzentration der Ausgangslauge ist dementsprechend eine Verdünnung der Lauge mit Wasser im Verhältnis 1 : 1,6 bis 1 : 2 nötig. Eine Verdünnung der Buchenholzsulfitablauge um das $2\frac{1}{2}$ –3fache würde bei der technischen Futterhefeszüchtung im Großbetrieb infolge der zu bewältigenden riesigen Flüssigkeitsmengen eine enorme Belastung bedeuten. Es würden nicht nur entsprechend vergrößerte Anlagen erforderlich, sondern auch die Gesteungskosten für die zu erzeugende Futterhefe würden eine wesentliche Erhöhung erfahren. Der mit der Sulfitablauge verbundene Vorteil des billigsten Kohlenhydrats für die Futtereweißgewinnung würde dadurch aufgehoben sein. Auch die Weiterverwertung der verheften zuckerfreien Ablaugen könnte durch die Verdünnung erschwert und wirtschaftlich untragbar werden. Falls in einem Zellstoffwerk Nadelholz und Buchenholz nebeneinander verarbeitet werden, wäre es möglich, die Buchenholzsulfitablauge auf die eben noch tragbare Konzentration mit Nadelholzsulfitablaugenschlempe zu verdünnen. Die bei der Alkoholgärung verbleibenden Pentosen der Nadelholzlauge würden dadurch nutzbar gemacht und zugleich der Gesamtzuckergehalt des verdünnten Laugengemisches heraufgesetzt werden.

Die Natur der in der Buchenholzsulfitablauge wirkenden Hemmstoffe ist noch nicht klar erkannt. Die anfängliche Vermutung, daß die Giftwirkung durch irgendwelche Zersetzungsprodukte der Pentosen verursacht wird, konnte nicht bewiesen werden. Bei Züchtungen von *Torula utilis* in Glucose übte die Zugabe von Xylosezersetzungsprodukten jedenfalls keinen Einfluß aus. Die Erhaltung der ursprünglichen Zuckerkonzentration der Ablauge muß bei der Verhefung angestrebt werden. Versuche, durch besondere Behandlung eine „Entgiftung“ der Buchenholzsulfitablauge zu erreichen, sind noch nicht abgeschlossen.

In der nachstehenden Tabelle sind einige Ausbeutezahlen aus einer Dauerzüchtungsreihe von *Torula utilis* in verdünnter Buchenholzsulfitablauge mit nur anorganischem Stickstoff zusammengestellt.

Nr.	Ausbeute, bezogen auf vergärbaren Zucker plus Pentosendifferenz			Pentosenzüchtigungsgrad
	Hefetrockensubstanz %	Rohprotein %	aschefreie Trockensubstanz %	
1	57,4	30,9	52,6	90,6
2	58,5	33,6	53,2	92,1
3	58,9	32,9	53,2	92,6
4	63,1	34,8	57,2	92,6
5	55,4	29,6	49,4	95,4
6	62,6	32,8	56,6	93,8
7	68,4	35,5	60,8	91,4

Die Beurteilung der Hefe- und Eiweißausbeuten aus Buchenholzsulfitablauge stößt auf Schwierigkeiten. Der Gesamtzuckergehalt, d. h. die Summe des vergärbaren Zuckers plus Pentosen, erfaßt nicht sämtliche verhefbaren Substanzen der Buchenholzsulfitablauge.

Bei Bezug auf den bei der Verhefung verbrauchten Gesamtzucker, nämlich vergärbaren Zucker plus Pentosendifferenz (= bei der Verhefung verschwundene Pentosenmenge), ergeben sich Hefe- und Rohproteinausbeuten, die bedeutend höher sind als die praktisch möglichen Standardausbeuten (6). Durch einen erhöhten Aschegehalt in der Hefe konnte diese Tatsache nicht erklärt werden, denn auch die Ausbeuten an aschefreier Trockensubstanz liegen über den möglichen Höchstaussbeuten. Bei der Gesamtzuckerbestimmung analytisch nicht erfaßte Substanzen, die bei der Verhefung assimiliert werden, mußten die Ursache der erhöhten Ausbeute sein. Zunächst wurde dabei an Poly-Uronsäuren gedacht, die zu den Pentosanen in enger Beziehung stehen und in Sulfitablaugen auch nachgewiesen wurden (7). Die Bestimmungsmethode für Hexuronsäuren beruht auf der Tatsache, daß diese bei Salzsäuredestillation Furfurol und Kohlendioxyd liefern und das letztere quantitativ erfaßt wird. Die von B. Tollens und K. U. Lefèvre angegebene und von A. W. van der Haar (8) verbesserte apparative Ausführung der Bestimmungsmethode für Hexuronsäuren bedurfte wegen der anwesenden schwefligen Säure einiger Abänderungen. Für zwei Buchenholzsulfitablaugen wurden auf Grund des gefundenen Kohlendioxyds 0,25 und 0,30 g Uronsäure bzw. 0,23 und 0,28 g Uronsäurelacton in 100 cm³ Lauge berechnet. Der Uronsäureanteil ist im Vergleich zum Gesamtzuckergehalt von 2,7 und 4,2% nicht unbedeutend. Dabei ist allerdings noch offen, ob das gefundene Kohlendioxyd allein aus Uronsäuren stammt und nicht auch von anderen Substanzen bei der Salzsäuredestillation Kohlendioxyd abgespalten wird. Nachdem Züchtungsversuche von *Torula utilis* in reiner Glucuronsäure negativ verliefen, konnten anwesende Uronsäuren keinesfalls die Ursache der Ausbeutedivergenz sein. Es mußte daher eine andere Kohlenstoffquelle vorliegen.

Sulfitablaugen enthalten flüchtige Säuren, insbes. Essigsäure (9). Bei der Hydrolyse von Buchenholz wird im Gegensatz zu Nadelholz eine verhältnismäßig große Menge Essigsäure frei. Die Ausnutzung der Essigsäure als Kohlenstoffquelle bei der Hefezüchtung wurde schon vor längerer Zeit von H. Fink, J. Krebs u. R. Lechner beschrieben (10). Die zur Verhefung angewandte Buchenholzsulfitablauge enthielt auch tatsächlich flüchtige Säuren, u. zw. Mengen von 0,53 bzw. 0,47 g je 100 cm³ berechnet als Essigsäure bei einem Gesamtzuckergehalt von 2,7 bzw. 4,2%. Die Anwesenheit von Essigsäure in der Buchenholzsulfitablauge erklärte auch die schon früher gemachte Beobachtung, daß in Buchenholzsulfitablauge bei der Züchtung eine Säureminderung eintritt und der für die Verhefung erforderliche Säuregrad nur durch Säurezugabe aufrechterhalten werden kann. Ob in der Buchenholzsulfitablauge noch andere von *Torula utilis* verwertbare Kohlenstoffverbindungen enthalten sind, steht noch offen.

Für die analytische Bewertung der Buchenholzsulfitablaugen und für die Beurteilung von Ausbeuten bei der Verhefung von Buchenholzsulfitablaugen genügt die Bestimmung des Gesamtzuckers nicht, sondern es muß dabei auf den Begriff „verhefbare Substanz“, der alle verwertbaren Kohlenstoff-

quellen einschließt, bezogen werden. Die Bewertung der Buchenholzsulfitablauge zur Verhefung wird dadurch allerdings umständlich und zeitraubend.

Die Untersuchung wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Die Buchenholzsulfitablaugen wurden von Feldmühle, Papier- und Zellstoffwerke A. G., Odermünde, und Zellstofffabrik Waldhof, Mannheim-Waldhof zur Verfügung gestellt.

Mikroskopische Methoden zur Identifizierung organischer Substanzen (Auszug*)

Von Prof. Dr. L. KOFLER, Pharmakognostisches Universitätsinstitut, Innsbruck.

Vor zwei Jahren bereits ist in dieser Zeitschrift ein Aufsatz über das obige Thema erschienen¹⁾. Seitdem hat die Methode der **Schmelzpunktmikrobestimmung** weitere Verbreitung gefunden, da sie nicht nur in der Mikrochemie gute Dienste leistet, sondern auch dann, wenn genügend Substanz zur Verfügung steht. Unter dem Mikroskop kann man das Verhalten jedes einzelnen Kriställchens oder Partikelchens vor, bei und nach dem Schmelzen genau verfolgen und erfährt dadurch sehr viel mehr kennzeichnende Eigenschaften einer Substanz als bei der Schmelzpunktmakrobestimmung. Bei zahlreichen viel verwendeten organischen Stoffen wurde auf diese Weise eine Fülle von Eigenschaften festgestellt, die bisher der Beobachtung entgangen waren; manche Substanz, die im Handel und im Schrifttum als chemisch reinst galt, erwies sich bei der Schmelzpunktmikrobestimmung als nicht einheitlich. Eine erneute, eingehendere Beschreibung des Gebietes erschien daher erwünscht. Ausführlich sind in der Beiheftarbeit die Mikroschmelzpunktapparate geschildert, ihre Handhabung sowie die Herstellung der mikroskopischen Präparate. Trotz ihrer Einfachheit erfordert die Durchführung der Methode und die Deutung der Beobachtungen eine gewisse Übung. Es ist deshalb wesentlich, daß die Angaben des „Beiheftes“ genauestens beachtet werden. Ein eigener Abschnitt enthält außerdem Übungsbeispiele, die sorgfältig erprobt sind und sich in wenigen Stunden durcharbeiten lassen. Sie sind bestimmt, dem Anfänger Einblick in das Verfahren und die Möglichkeit der späteren Anwendung für seine eigenen Zwecke zu verschaffen.

Während man nun bei der Makromethode im Capillarröhrchen nur die „durchgehende“ Bestimmung kennt, erlaubt die Mikromethode die Schmelzpunktbestimmung auch mit Hilfe des „Gleichgewichtes“. Hierbei wird die Heizung des Apparates abgestellt, bevor die Substanz ganz geschmolzen ist. Beim Sinken der Temperatur beginnen die in den größeren Schmelztropfen noch vorhandenen Substanzreste wieder zu wachsen; dann wird angeheizt, bis die Kristallreste neuerlich zu schmelzen anfangen. Durch beliebiges Wiederholen dieses Spieles kann man so bei vielen unzersezt schmelzenden Stoffen das Gleichgewicht zwischen fester und flüssiger Phase einstellen und den Schmelzpunkt besonders genau bestimmen.

Aber auch bei Substanzen, die unter Zersetzung schmelzen, ist die Mikromethode dem Makroverfahren in vielen Fällen überlegen, da sich die Begleitumstände der Zersetzung unter dem Mikroskop sehr viel besser beobachten lassen als im Capillarröhrchen. Unerläßlich sind bei der Mitteilung der Zersetzungstemperatur Angaben über die Geschwindigkeit des Erhitzens. Auch bei Lösungsmittel enthaltenden Substanzen offenbart die Mikromethode nicht selten Tatsachen, die bei der Makromethode der Beobachtung entgehen. Viele falsche Literaturangaben sind darauf zurückzuführen, daß sich die Vorgänge im Capillarröhrchen nicht so genau verfolgen lassen. Einen weiteren Anlaß zu Abweichungen zwischen Mikro- und Makroschmelzpunkt bietet die Polymorphie, die viel häufiger ist, als man bisher angenommen hat. Weitere Abschnitte behandeln den Mischschmelzpunkt und die Streuung der Schmelzpunkte, an der — wie sich herausgestellt hat — die Substanzen selbst schuld sind, indem ihre Reinheit zu wünschen übrigläßt. Einerseits stellen diese Streuungen eine gewisse Unbequemlichkeit dar; andererseits

Literatur.

- (1) Zusammenfassende Darstellungen: H. Fink, Z. Spiritusind. **59**, 373 [1936]; diese Ztschr. **51**, 475 [1938]; Vorratspflege u. Lebensmittelforschung **1**, 107 [1938]; R. Lechner, Holz als Roh- u. Werkstoff **1**, 603 [1938]; ferner: H. Fink u. R. Lechner, diese Ztschr. **49**, 775 [1936]. — (2) Übersicht: F. F. Nord, E. Dammann u. H. Hofstetter, Biochem. Z. **285**, 241 [1936]; K. R. Dietrich u. O. L. Klammerth, Chemiker-Ztg. **63**, 763 [1939]. — (3) R. Lechner, Biochem. Z. **300**, 204 [1939]; **301**, 170 [1939]; s. a. Nachtrag bei: H. Fink u. J. Krebs, ebenda **300**, 175 [1939]. — (4) Z. Spiritusind. **62**, 251 [1939]. — (5) H. Fink, R. Lechner u. J. Krebs, Biochem. Z. **299**, 28 [1938]. — (6) H. Fink, J. Krebs, ebenda **299**, 1 [1938]. — (7) E. Höglund, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **177**, 248 [1928]. — (8) A. W. von der Haar: Anleitung zum Nachweis, zur Trennung und Bestimmung der reinen und aus Glucosiden usw. erhaltenen Monosaccharide u. Aldehydsäuren, Berlin 1920, Gebr. Borntraeger. — (9) H. Vogel: Die Sulfitzellstoff-Abfälle und ihre Verwertung, Stuttgart 1939, Ferdinand Enke. — (10) H. Fink, J. Krebs u. R. Lechner, Biochem. Z. **299**, 13 [1937]. Eingep. 13. Januar 1940. [A. 21.]

zeigen sie aber erneut die Überlegenheit der Mikromethode, denn trotz guter Reproduzierbarkeit und anscheinender Gleichmäßigkeit sind die mit der Makromethode gewonnenen Schmelzpunkte oft nur Mischschmelzpunkte. Die mikroskopische Schmelzpunktbestimmung ermöglicht daher ein besseres Urteil über die Einheitlichkeit einer Substanz.

Auch über den zweiten kennzeichnenden Wert, der sich unter dem Mikroskop bestimmen läßt, den **Brechungsexponenten der Schmelzen**, finden sich in der eingangs erwähnten Arbeit Angaben, die grundsätzlich auch heute noch gelten. Die Bestimmung erfolgt, indem man das mikroskopische Präparat der zu prüfenden Substanz mit ein paar Stäubchen eines Glaspulvers von bekanntem Brechungsexponenten vergleicht. Zu diesem Zwecke steht eine Skala von 23 Pulvern mit Brechungsexponenten zwischen 1,3400 und 1,6718 zur Verfügung. Die Bestimmung kann unmittelbar an die Schmelzpunktbestimmung angeschlossen werden, ohne daß der Apparat vorher abgekühlt wird. Da die als *Beckesche Linie* bezeichnete Lichterscheinung an der Grenze zweier Medien am deutlichsten bei parallelstrahligem Licht, also bei kleiner Beleuchtungsapertur, auftritt, verwendet man am besten den Planspiegel und entfernt den unter dem Objektisch des Mikroskops befindlichen Kondensor und die kleine Kondensorlinse des Mikroschmelzpunktapparates. An Substanz sind 1–2 mg erforderlich.

Im weißen Licht können die Grenzflächen zwischen zwei Medien nur dann vollständig verschwinden, wenn die Dispersion in beiden Medien gleich oder annähernd gleich ist. Sind aber größere Unterschiede vorhanden, so treten, wenn Gleichheit der Lichtbrechung für eine bestimmte Wellenlänge erreicht ist, an der Grenze farbige Säume auf. Die Untersuchungen werden deshalb nicht in weißem Licht ausgeführt, sondern nach Vorschalten eines Rotfilters, das auch die Untersuchung der Lichtbrechung von farbigen Schmelzen erleichtert. Verwendet werden 1 mm dicke Rotfilter RG 1 der Jenaer Glaswerke, Schmelze Nr. 34904. Die Reproduzierbarkeit ist i. allg. sehr gut, aber nicht in allen Fällen gleich weitgehend, da sie von verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie Dispersionsunterschiede zwischen Glaspulver und Schmelze, Zersetzlichkeit der Substanz, Form der Glassplitter. Die Schwankungen dürften aber $\pm 1^{\circ}$ nicht überschreiten, die Abweichungen sind also nicht größer, als man sie mit dem Refraktometer erhält, wenn die Temperatur um $\pm 1^{\circ}$ schwankt. Das entspricht im Brechungsexponenten durchschnittlich $\pm 0,0003$.

Durch Vergleich der Brechungsexponenten einer Substanz mit zwei Gläsern der Skala kann man auch den Temperaturkoeffizienten annähernd berechnen, d. i. der pro 1° sich ergebende Durchschnittswert der Refraktationsverminderung bei steigender Temperatur. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß die Glaspulver mit sog. mittleren Brechungsexponenten bezeichnet sind, während mit rotem Licht gearbeitet wird. Infolgedessen lassen sich nicht die wahren Temperaturkoeffizienten angeben. Trotzdem sind sie von großem Wert, da sie eine weitere Sicherheit für die Identifizierung einer Substanz bringen können. Voraussetzung ist, daß die betr. Substanz ein Erhitzen weit über den Schmelzpunkt hinaus verträgt, ohne sich zu zersetzen oder sich zu verflüchtigen. Bei zersetzlichen Substanzen ist eine genaue Bestimmung des Brechungsexponenten unmöglich. Bei sehr starker Flüchtigkeit kann man mit Erfolg die Mikrocuvette von Fischer benutzen.

Schmelzpunkt und Brechungsexponent bilden somit ein ausgezeichnetes Hilfsmittel zum raschen Erkennen organischer Substanzen. Für die praktische Ausnützung wurde deshalb

* Die ausführliche Arbeit erscheint als „Beiheft zu der Zeitschrift des Vereins Deutscher Chemiker Nr. 36“ und hat einen Umfang von 28 Seiten, einschl. 23 Abb. u. 6 S. Tab. Bei Vorausbestellung bis zum 11. Mai 1940 Sonderpreis von RM. 2,40 statt RM. 3,20. Zu beziehen durch den Verlag Chemie, Berlin W 35, Woyrschstraße 87. — Bestellschein im Anzeigenteil.

¹⁾ L. Kofler, diese Ztschr. **51**, 703 [1938].