

Gegen salzsaures *p*-Nitrophenyl-hydrazin verhielt sich der Körper ebenso wie die Anilino-Verbindung. Das entstandene Dinitro-osazon zersetzte sich bei 300°.

0.0408 g Subst.: 0.0887 g CO₂, 0.0183 g H₂O.

C₂₃H₂₂O₅N₆. Ber. C 59.7, H 4.8. Gef. C 59.3, H 5.0.

Von Semicarbazid wurde der Heteroring des Naphthylamino-Derivates nicht aufgesprengt.

2.4.6-Trimethyl-2-rhodan-cumaranon.

Wurde wie das niedere Homologe dargestellt. Kurze, weiße Prismen aus Ligroin vom Sdp. 50–60°. Schmp. 78°. In den meisten organischen Mitteln leicht löslich.

0.1008 g Subst.: 5.2 ccm N (18°, 765 mm). — C₁₂H₁₁O₂NS. Ber. N 6.0. Gef. N 6.0.

Als man auf die Substanz Semicarbazid ebenso lange einwirken ließ wie auf die Anilino-Verbindung, gewann man gleichfalls das Ausgangsmaterial unverändert zurück.

Marburg, Chemisches Institut.

422. Erich Schmidt, Friedrich Trefz und Hans Schnegg: Quantitative Bestimmung der Hexosen durch Gärung. (Zur Kenntnis pflanzlicher Inkrusten, VII).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften u. d. Gärungsphysiol. Institut d. Hochschule für Landwirtschaft u. Brauerei in Weihenstephan.]

(Eingegangen am 7. Oktober 1926.)

I.

Für die Aufklärung konstitutioneller Fragen der pflanzlichen Zellmembran ist die quantitative Bestimmung der Hexosen in den Hydrolysaten von Hemi-cellulosen außerordentlich wichtig. Von den in Hemi-cellulosen vorkommenden Hexosen: *d*-Glucose, *d*-Fructose, *d*-Galaktose und *d*-Mannose ist auf chemischem Wege nur die letzte Verbindung auf Grund ihrer schwerlöslichen Phenyl-hydrzone¹⁾ bestimmbar. Auf biochemischem Wege besteht die Möglichkeit, Galaktose zu ermitteln, infolge ihres abweichenden Verhaltens gegenüber einigen Hefen. Während nämlich die übrigen Monosen, die man auch als Zymo-hexosen bezeichnet, von allen Hefen vergoren werden, wird die Galaktose von vielen Hefen nicht oder erst nach längerer Zeit angegriffen. Wird daher ein galaktose-haltiges Zuckergemisch mit einer Hefe behandelt, die Galaktose nicht vergärt, so erhält man die Menge der Zymo-hexosen. Eine zweite Bestimmung mit Hilfe einer Galaktose vergärenden Hefe ergibt die Summe aller Hexosen. Aus der Differenz der bei den Gärungen erhaltenen Werte errechnet man die Menge der Galaktose.

Wir konnten nun feststellen, daß das bisherige Verfahren, Zucker durch spezifische Gärung quantitativ zu bestimmen, noch wenig ausgebildet, einer weitgehenden Verbesserung bedurfte, um den analytischen Anforderungen bei der Ermittlung konstitutioneller Verhältnisse von Polysacchariden zu

¹⁾ E. Bourquelot und H. Hérissé, C. r. **129**, 339 [1899]; F. Lenze, B. Pleus und J. Müller, J. pr. [2] **101**, 236ff. [1921].

genügen. Wir haben daher eine Methode ausgearbeitet, die es gestattet, Galaktose neben den übrigen Hexosen durch auswählende Gärung quantitativ zu bestimmen.

Als Maß der mittels Gärung bestimmbaren Zucker dient die entwickelte Menge Kohlendioxyd. Diese ist in weitgehendem Maße von der Art der angewandten Hefe und von den Bedingungen abhängig, unter denen die Gärung angesetzt wird und verläuft. Diese Tatsachen sind bei einer quantitativen Zucker-Bestimmung besonders zu berücksichtigen. Es müssen daher für die Gärung Bedingungen geschaffen werden, die jederzeit reproduzierbar sind und einen gleichmäßigen Verlauf der Gärung bei jeder Bestimmung gewährleisten; ferner müssen stets für alle Bestimmungen Reinkulturen von Hefen verwandt werden. Die verschiedentlich empfohlenen²⁾ Bäcker-Hefen sind infolge ihrer mangelnden biologischen Beschaffenheit und wechselnden Zusammensetzung zu verwerfen³⁾. Auf Grund dieser Erkenntnis hat A. J. Kluver⁴⁾ eine Methode der Zucker-Bestimmung unter Benützung von Reinkulturen ausgearbeitet. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, bei der Vergärung von Hydrolysen-Produkten der Polysaccharide in vielen Fällen zu versagen. A. J. Kluver führt nämlich die Gärung in der Weise aus, daß die zu vergärenden Lösungen mit einigen Hefezellen geimpft werden. Die Hefe muß sich zunächst in dem ihr dargebotenen Substrat vermehren und kann erst dann ihre Gärtätigkeit beginnen. Nun enthalten aber die Hydrolysate meist geringe Mengen von Substanzen, die bei der Hydrolyse durch die Einwirkung der Säure auf die Zucker entstanden sind. Diese Huminstoffen können eine Weiterentwicklung der Hefezellen und somit die Gärung verhindern⁵⁾. Diese Mängel der Kluverschen Methode werden beseitigt, wenn dem Gärsubstrat von vornherein die zur Gärung notwendige Menge einer Reinkultur zugesetzt wird.

Um die Bestimmung der Galaktose neben den anderen gärfähigen Zuckern durchzuführen, ist es notwendig, Galaktose vergärende und Galaktose nicht vergärende Hefen zu verwenden, die in größeren Mengen zu erhalten sind. Bekanntlich besitzt die in Bierwürze leicht zu züchtende Hefe *Schizosaccharomyces Pombe* die Fähigkeit, Galaktose nicht, wohl aber die übrigen Hexosen zu vergären. Zur Vergärung von Galaktose wird von A. J. Kluver *Saccharomyces fragilis* empfohlen. Da sich aber diese Hefe infolge ihrer großen Empfindlichkeit nicht zur Aufzucht in größeren Mengen eignet, wurde versucht, mittels *Saccharomyces cerevisiae* ohne besondere Vorbehandlung Galaktose nebst den Zymo-hexosen zu vergären. Es ergab sich, daß Münchener untergärige Löwenbräu-Hefe unter geeigneten Bedingungen innerhalb 24 Stdn. Zymo-hexosen und Galaktose quantitativ vergärt.

Die Gärversuche wurden zunächst mit Galaktose allein, dann im Gemisch mit Glucose durchgeführt, ohne den Zucker-Lösungen Nährstoffe oder Puffer-Lösungen beizufügen. Indessen waren die gefundenen Zucker-Mengen infolge Selbstgärung der Hefe stets zu hoch, da diese bei der zur Vergärung der Galaktose notwendigen Versuchsdauer von etwa 30 Stdn. einen merklichen Einfluß ausübt. Zugabe von primärem Kalium-

²⁾ van der Haar, Anleitung zum Nachweis, zur Trennung und Bestimmung der reinen und aus Glucosiden usw. erhaltenen Monosaccharide und Aldehydsäuren (Gebr. Borntraeger, Berlin 1920), S. 109.

³⁾ C. B. van Niel und F. Visser 't Hooft, B. 58, 1606 [1925].

⁴⁾ van der Haar, l. c., S. 111 ff. ⁵⁾ van der Haar, l. c., S. 113

phosphat bzw. Hefewasser vermag die Selbstgärung nicht zu verhindern. Andererseits ist es nicht zugänglich, die im Leerversuch durch Selbstgärung angezeigte Zucker-Menge von den Gärungswerten der Zucker-Lösungen als Korrektion abzuziehen, da die Selbstgärung der Hefe im Leerversuch größer ist als in den Zucker-Lösungen⁶⁾.

Nach Buchner und Mitscherlich⁶⁾ gelingt es nun, die Selbstgärung der Hefe durch 24-stdg. Ausbreiten an der Luft zu beseitigen. Hierdurch verschwindet die Selbstgärung, ohne daß die Hefe eine merkliche Einbuße an Gärkraft erleidet. Nach Beseitigung der Selbstgärung läßt sich mittels Löwenbräu-Hefe Galaktose sowohl allein wie im Gemisch mit Glucose ohne Zusatz von Nährsalzen quantitativ bestimmen. Allerdings sind für die quantitative Bestimmung der Galaktose etwa 30 Stdn. erforderlich. Diese lange Versuchsdauer zu verkürzen, schien wünschenswert. Da nun die Galaktose-Gärung an die Neubildung⁷⁾ von Hefezellen gebunden ist, versuchten wir, die Gärung durch Zugabe einer Nährlösung zu beschleunigen, die 0.5-proz. sekundäres Ammoniumphosphat und 0.5-proz. primäres Kaliumphosphat enthielt. Indessen trat die erwartete Beschleunigung nicht ein; außerdem waren die erhaltenen Werte sowohl für Glucose als auch Galaktose zu niedrig. Für Galaktose ergaben sich Abweichungen von -5.6% , für Glucose -10.4% vom theoretischen Wert. Diese Ergebnisse veranlaßten uns, dem p_H der angewandten Nährlösung unsere Aufmerksamkeit zuzuwenden.

Der p_H -Einfluß des Nährsubstrats auf den Verlauf der alkoholischen Gärung ist von verschiedenen Forschern⁸⁾ eingehend untersucht worden. Die Arbeiten behandeln den Einfluß des p_H auf die Geschwindigkeit der Kohlendioxyd-Entwicklung in den ersten Stunden der Gärung, während der Einfluß des p_H auf die Gesamtausbeute an Kohlendioxyd bisher noch nicht Gegenstand der Untersuchung war. Es lag daher nahe, auch in diesem Fall einen Einfluß des p_H anzunehmen. Diese wichtige Frage ist bei der Methodik der quantitativen Zucker-Bestimmung durch Gärung bisher nicht genügend berücksichtigt worden. Die von uns ausgeführten Versuche zeigen indessen deutlich, daß die entwickelte Kohlendioxyd-Menge vom p_H der Nährlösung abhängig ist. Daher dürfen Nährlösungen nicht verwandt werden, deren p_H -Einfluß auf die Gärung unbekannt ist. Es ergibt sich demnach die Notwendigkeit, eine genau definierte Hefe zu benutzen und mittels eines Puffers ein geeignetes p_H des Gärsubstrats einzustellen. Das p_H der oben erwähnten Phosphat-Lösung, die eine Verminderung der Kohlendioxyd-Ausbeute bewirkt, beträgt $p_H = 6.8$. Verschiebt man nun das p_H in das saure Gebiet, so läßt sich die Kohlendioxyd-Ausbeute steigern. Diese ist bei einem $p_H = 5.5$ quantitativ in Bezug auf die angewandte Zuckermenge. Gleichzeitig tritt eine wesentliche Beschleunigung der Galaktose-Gärung ein, die nicht mehr in 30 Stdn., sondern bereits nach 18 Stdn. quantitativ beendet ist. Diese Beschleunigung zeigt sich noch deutlicher bei der Vergärung eines Gemisches von Galaktose und Glucose. Unter diesen Bedingungen ist nach

⁶⁾ vergl. H. v. Euler und P. Lindner, Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung (Akademische Verlagsgesellschaft m. b. H., Leipzig 1915), S. 144.

⁷⁾ N. L. Söhngen und C. Coolhaas, Ztrbl. f. Bakteriologie usw. II. Abt., **66**, 5 [1926].

⁸⁾ E. Hägglund, Hefe und Gärung in ihrer Abhängigkeit von Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen (F. Enke, Stuttgart 1915); E. Hägglund und Mitarbeiter, Bio. Z. **155**, 334, **166**, 234 [1925], **169**, 200, **170**, 102 [1926]; H. Lüers, Ztschr. f. d. ges. Brauwesen **37**, 79 [1914].

5 $\frac{1}{2}$ Stdn. die Glucose quantitativ, die Galaktose zu 96.5% vergoren. Nach van der Haar, der zur quantitativen Bestimmung der Zymo-hexosen neben Galaktose ebenfalls *Saccharomyces cerevisiae* empfiehlt, soll diese Hefe die Galaktose innerhalb 4 Stdn. nicht angreifen. Unsere Versuche zeigen indessen, daß für Gemische von Galaktose und Glucose die von van der Haar empfohlene Methode keine Anwendung finden darf, da die Galaktose bereits nach 4 Stdn. von *Saccharomyces cerevisiae* merklich vergoren worden ist. Somit ergibt sich für die quantitative Bestimmung der Summe der gärfähigen Monosen einschließlich der Galaktose, daß diese mittels Löwenbräu-Hefe bei $p_H = 5.5$ (Phosphat-Puffer) innerhalb 18 Stdn. mit Erfolg ausgeführt werden kann.

Ebenso deutlich wie bei der Löwenbräu-Hefe zeigt sich die p_H -Abhängigkeit der Kohlendioxyd-Ausbeute bei den Bestimmungen mit *Schizosaccharomyces Pombe*. Diese Hefe besitzt, wie bereits erwähnt, kein Gärvermögen gegenüber Galaktose und wurde deshalb zur Bestimmung der Zymo-hexosen verwendet. Bemerkenswert ist, daß bei dieser Hefe keine Selbstgärung⁹⁾ auftritt, weil sie kein Glykogen enthält. Deshalb bietet die Verwendung dieser Hefe besonderen Vorteil, da sich eine Vorbehandlung zur Beseitigung der Selbstgärung erübrigt.

Zum Studium der Bedingungen, unter denen sich die Gärung mittels *Schizosaccharomyces Pombe* quantitativ vollzieht, wurde Glucose verwandt. Bei einem Phosphat-Zusatz von $p_H = 5.5$ blieben die erhaltenen Kohlendioxyd-Mengen unterhalb den theoretischen, obwohl die Gärung sehr rasch und stürmisch einsetzte. Auch bei dieser Hefe führt eine Erhöhung der Acidität der Glucose-Lösung zu einer größeren Ausbeute an Kohlendioxyd. Da sich der Phosphat-Puffer in stärker saurem Bereich nicht mehr genau einstellt, verwendet man zweckmäßig Natriumacetat und Essigsäure als Puffer. Bereits bei $p_H = 4$ zeigt sich vermehrte Kohlendioxyd-Entwicklung. Bei $p_H = 3.7$ werden die theoretischen Werte erreicht, die bei weiterer Steigerung der Acidität auf $p_H = 3$ unverändert erhalten bleiben. Demnach ergibt sich, daß die quantitative Vergärung der Zymo-hexosen mittels *Schizosaccharomyces Pombe* bei $p_H = 3$ bis 3.7 (Acetat-Puffer) auszuführen ist.

Über die Bestimmung der Galaktose im Gemisch mit den Zymo-hexosen kann man sich zusammenfassend folgendermaßen äußern: Die Summe von Zymo-hexosen und Galaktose wird bei $p_H = 5.5$ (Phosphat-Puffer) nach Ausschaltung der Selbstgärung mittels Löwenbräu-Hefe nach 24 Stdn. richtig angegeben. Die Bestimmung der Zymo-hexosen erfolgt mittels *Schizosaccharomyces Pombe* bei $p_H = 3.7$ (Acetat-Puffer). Aus der Differenz der mit den beiden Hefen gefundenen Werte ergibt sich die Menge der Galaktose.

II.

In der VI. Mitteilung: Zur Kenntnis pflanzlicher Inkrusten haben wir angegeben, daß am Aufbau der Hemi-cellulosen H_8 in der Zellmembran von Flachs (*Linum usitatissimum*) geringe Mengen Galaktose beteiligt sind¹⁰⁾. Die damals nach den Angaben von van der Haar aus-

⁹⁾ A. Klöcker, Die Gärungsorganismen (Urban und Schwarzenberg, Berlin-Wien 1924), S. 212.

¹⁰⁾ E. Schmidt, W. Haag und I. Sperling, B. 58, 1402 [1925].

geführte Galaktose-Bestimmung, deren Unsicherheit wir im I. Teil der Arbeit schilderten, ließ uns die Richtigkeit der Befunde bezweifeln. Die sowohl mittels *Saccharomyces cerevisiae*, wie *Schizosaccharomyces Pombe* ausgeführten Gärungen ergeben beide vollkommen übereinstimmende Werte für Hexosen, wonach diejenigen Hemi-cellulosen H_8 , die an Cellulose gebunden sind, keine *d*-Galaktose enthalten.

Vom Standpunkt der Zellmembran-Forschung halten wir diesen Befund deshalb für bemerkenswert, weil der bisher ausschließliche Nachweis der Galaktose als Bestandteil der Hemi-cellulosen der Inkrusten (H_1) die besondere Beziehung der Galaktose zur Galakturonsäure deutlich hervortreten läßt¹¹⁾.

Die gleiche Schlußfolgerung ergibt sich aus den Untersuchungen der Zellmembran der Fichte (*Picea excelsa*), wonach in den an die Cellulose gebundenen Hemi-cellulosen H_8 keine Galaktose vorhanden ist. Die in den Hemi-cellulosen des Fichtenholzes aufgefundene Galaktose¹²⁾ ist somit ebenfalls als Baustein der Hemi-cellulosen der Inkruste (H_1) zu betrachten.

Beschreibung der Versuche.

I.

1a. Die Zucker bzw. Hydrolysate werden zur Gärung in 10-ccm-Meßkölbchen mit entsprechenden Puffer-Lösungen bis zur Marke aufgefüllt. Die Kölbchen werden hierauf mit einem Wattepfropfen fest verschlossen.

Die zweckmäßig in größerer Menge vorrätigen Puffer-Lösungen befinden sich vorteilhaft in 500-ccm-Stehkolben, die zur bequemen Entnahme von Flüssigkeit mit seitlich angeschmolzenem, nach oben gerichtetem Glasrohr versehen sind. Kolbenhals und Ansatzrohr werden mit einem Wattebausch verschlossen. Zucker- sowie Puffer-Lösungen werden zweckmäßig in einem Kartoffel-Dämpfer 20 Min. im Wasserdampf sterilisiert, eine Operation, die nach jedesmaligem Gebrauch der Lösungen erneut erfolgen muß. Verluste an Lösungsmittel treten bei diesem Verfahren nicht ein, da nach dem Abkühlen der Meniscus an der Marke der Meßkölbchen sich unverändert einstellt. Die sterilen Lösungen können beliebig lange aufbewahrt und für Gärungen verwandt werden. Das für die Gärungen benutzte sterile Wasser wird durch Auskochen von destilliertem Wasser bereitet.

1b. Die für die Gärversuche verwandten Zucker-Präparate wurden durch Titration nach Auerbach-Bodländer¹³⁾ auf ihre Reinheit geprüft. Um alle Jod verbrauchenden Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Zucker-Präparate „Kahlbaum“ in 0.25-proz. wäßriger Chlordioxyd-Lösung bei Zimmer-Temperatur gelöst und 48 Stdn. aufbewahrt. Hierauf wurden die Zucker-Lösungen von Chlordioxyd mittels eines Luftstromes befreit, im Faust-Heimschen Apparat zur Trockne eingedampft und aus geeigneten Lösungsmitteln umkristallisiert. Sowohl für die Titration, wie für die quantitativen Gärversuche wurden Präparate verwandt, die unter 0.0001 mm und bei 78° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet waren.

¹¹⁾ F. Ehrlich und F. Schubert, *Bio. Z.* **169**, 13 [1926].

¹²⁾ F. Weld, J. B. Lindsay und B. Tollens, *B.* **23**, 2991 [1890]. Vergl. E. Hägglund, *Die Fabrikation des Zellstoffes aus Holz* (O. Elsner, Berlin 1926), S. 41 ff..

¹³⁾ F. Auerbach und E. Bodländer, *Z. Ang.* **36**, 602 [1923].

Durch die nachstehenden Titrationen erwiesen sich die angewandten Zucker als rein.

Glucose.	Angew. Sbst.	0.0998 g	
	Gef. „	0.0997 g	
	Verbrauchte ccm n_{10} -J-Lösung	11.07	
	Differenz in %	—0.1.	
Mannose.	Angew. Sbst.	0.0808 g	
	Gef. „	0.0809 g	
	Verbrauchte ccm n_{10} -J-Lösung	8.99	
	Differenz in %	+0.1.	
		I.	II.
Galaktose.	Angew. Sbst.	0.1040 g	0.1010 g
	Gef. „	0.1043 g	0.1005 g
	Verbrauchte ccm n_{10} -J-Lösung ...	11.58	11.16
	Differenz in %	+0.3	—0.5.

1c. Die Hydrolysate der Hemi-cellulosen werden in folgender Weise gewonnen¹⁴⁾: Etwa 0.25 g. Hemi-cellulosen, unter $\frac{1}{10000}$ mm und bei 78° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, werden in einem Schliffkölbchen mit 0.5—1.0 g 75-proz. Schwefelsäure übergossen. Mittels eines Glasstabes wird das Polysaccharid innig mit der Schwefelsäure verrieben und 24 Stdn. bei Zimmer-Temperatur aufbewahrt. Durch Zusatz von Wasser wird die Säure auf 5—10% verdünnt und das Reaktionsgemisch $2\frac{1}{2}$ Stdn. auf dem Babo-Blech unter Rückfluß gekocht. Der nicht hydrolysierte Anteil wird auf einem gehärteten und bei 100° getrockneten, im verschlossenen Wägelglas gewogenen Filter abfiltriert. Das Filter wird abermals bei 100° getrocknet und gewogen. Das Filtrat wird in einem Erlenmeyer-Kölbchen unter kräftigem Schütteln mit mehr als der berechneten Menge Bariumcarbonat „zur Analyse“ bei Wasserbad-Temperatur neutralisiert. Hierauf werden Lösung und Niederschlag in einer dunkel glasierten Porzellanschale unter stetem Umrühren auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird möglichst vollständig in ein Schliffkölbchen übergeführt und der in der Porzellanschale noch verbliebene Anteil 2-mal mit je 30 ccm heißem 80—90-proz. Alkohol in den Kolben gespült. Die vereinigten Niederschläge werden auf dem Babo-Blech 1 Stde. unter Rückfluß mit Alkohol ausgekocht. Hierauf wird der Niederschlag auf einer Nutsche abgesaugt, der Rundkolben und die zuvor benutzte Porzellanschale mit kleinen Mengen Alkohol mehrere Male ausgespült, der auch zum Waschen des Niederschlages dient. Die alkohol. Lösung wird nach dem Filtrieren durch ein gehärtetes Filter in einem Jenaer Becherglas (50 ccm) auf dem Wasserbade wiederholt nahezu eingedampft, bis auch die letzten Spuren von Alkohol entfernt sind. Der alkohol-freie Zucker-Sirup wird mit der entsprechenden Puffer-Lösung quantitativ aufgenommen, in einem 10-ccm-Meßkölbchen bis zur Marke aufgefüllt und sterilisiert.

2. Die den Reinkulturen entnommenen Hefen werden in sterilem Wasser aufgeschlämmt und abzentrifugiert. Eine in dieser Weise etwa 6-mal gewaschene Hefe ist von der zuvor anhaftenden Bierwürze vollkommen befreit. Von der so behandelten Hefe bereitet man in sterilem Wasser eine Aufschlammung, von der etwa 4 Tropfen aus der Lohnstein-Pipette für jeden Gärversuch verwandt werden (vergl. 3). Zur Beobachtung von Selbst-

¹⁴⁾ vergl. E. P. Clark, Journ. Biol. Chem. 51, 1 [1922].

gärung der entsprechenden Hefen in zucker-freien Puffer-Lösungen ist stets ein Kontrollversuch neben den Gärungen anzusetzen.

3. Als Gärungs-Saccharometer wurde der von Th. Lohnstein¹⁵⁾ angegebene Apparat verwandt. Vor der Benutzung sind die Apparate und sämtliche zu verwendenden Glasgeräte, sowie das Quecksilber zu sterilisieren. Das Quecksilber wird mit Wasser unter Zusatz einiger Tropfen konz. Salpetersäure geschüttelt, mehrmals durch einen Glasfilter-Tiegel filtriert, mit destilliertem Wasser säure-frei gewaschen und durch mehrstündiges Erhitzen auf 150° im Trockenschrank (Abzug) getrocknet und sterilisiert. Die Glasapparate werden nach Reinigen mit Dichromat-Schwefelsäure mit destilliertem Wasser, dann mit Alkohol nachgespült, die Öffnungen mit Watte verschlossen und durch 2-stdg. Erhitzen im Trockenschrank auf 150° sterilisiert. Obwohl ein vollkommen steriles Arbeiten im „Lohnstein“ sich nur schwer ermöglichen läßt, ist die schädigende Wirkung einer Infektion nicht zu befürchten, da die Menge der angewandten Hefe, zumal bei einer Versuchsdauer von nur 24 Stdn., einen natürlichen Schutz gegen fremde Keime bildet.

Für eine Bestimmung werden die sterilen Apparate zunächst mit Quecksilber beschickt, dessen Menge, für jeden Apparat angegeben, mittels einer Handwaage auf 0.1 g genau abgewogen wird. Hierauf werden die sterilen gepufferten Zucker-Lösungen bzw. Hydrolysate mittels Pipette (0.49 oder 0.5 ccm), die jedem Apparat beigelegt ist, auf das Quecksilber gegeben. Die Pipetten sind vollständig zu entleeren. Endlich werden ebenfalls aus einer „Lohnstein“-Pipette in jedem Apparat 4 Tropfen einer sterilen Aufschlammung der entsprechenden Hefe gegeben und die Glaskugel jedes Apparates mit dem eingefetteten Stopfen verschlossen. Zunächst müssen die Durchbohrungen von Stopfen und Hals der Kugel sich übereinander befinden, dann erfolgt durch Neigen des Apparates und gleichzeitiges Drehen des Schliffes, so daß Verschuß nach außen eintritt, genaue Einstellung des Quecksilbers auf den Nullstrich. Die Raum-Temperatur während der Einstellung ist genau zu ermitteln, da nach beendeter Gärung die Ablesung bei derselben Temperatur erfolgen muß. Sollte sich diese geändert haben, so müssen die Apparate vor der Ablesung in einem Wasserbade auf die Temperatur während der Einstellung auf den Nullstrich gebracht werden. Die Gärung erfolgt im Thermostaten bei 30°. Durch ein Metallgewicht wird das Herausdrücken des Stopfens während der Gärung verhindert. Erfolgte die Einstellung vor, die Ablesung nach der Gärung bei 20°, so ist nur eine Ablesung an der für 20° geeichten Skala notwendig. Bei anderen Temperaturen, ferner bei Abweichungen des Barometerstandes von 760 mm Druck, sind die in der Gebrauchsanweisung zum „Lohnstein“ angegebenen Formeln zu berücksichtigen.

Bis zu einem Gehalt von 1.7% Hexose gestattet der „Lohnstein“ noch 0.01% zu schätzen. Dort, wo sich das Steigrohr erweitert, wird die Ablesung wesentlich ungenauer. Die Apparate wurden deshalb nur in einem Bereich von 1.0—1.7% benutzt. Innerhalb dieses Intervalls können die Bestimmungen mit einer Abweichung von $\pm 4\%$ vom theoretischen Wert ausgeführt werden. Die Fehler sind unseres Erachtens auf die mangelhafte Befestigung der Skala am Apparat zurückzuführen. Eine entsprechende Verbesserung dürfte diesen Fehler verringern.

¹⁵⁾ Münchener med. Wochenschrift 46, 1671 [1899].

II.

Quantitative Bestimmung der Zymo-hexosen durch Schizosaccharomyces Pombe.

a) Bei $p_H = 3.7$.

Als Gärsubstrat diente für die Versuche unter 1 Glucose, unter 2 Galaktose, unter 3 ein Gemisch von Glucose und Galaktose. Die Puffer-Lösung wurde durch Vermischen von 10 ccm *n*-Essigsäure mit 1 ccm *n*-Natronlauge und Auffüllen auf 100 ccm bereitet.

1. Glucose.	I.	II.	III.
Angew. Subst. in %	1.47	1.47	1.37
Gef. „ „ %	1.46	1.46	1.32
Differenz „ %	—0.7	—0.7	—3.65

Zu I und II. Ablesung nach 18 Stdn.: [1.54 %, 20°¹⁶]; 716 mm Hg (20°¹⁷). — Nach 66 Stdn.: desgl.

Zu III. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.39 %, 20°], [11.9 %, 35°]; 714 mm Hg (19°).

2. Galaktose.

Angew. Subst. in %	2.39
Gef. „ „ %	0.00

Ablesung nach 24 Stdn.: [0.00 %, 20°]; 710 mm Hg (21°).

3. Glucose-Galaktose-Gemisch.

Angew. Subst. in %	0.88	Glucose,	0.57	Galaktose
Gef. „ „ %	0.85	„	—	„
Differenz „ %	—3.4		—	

Ablesung nach 24 Stdn.: [0.88 %, 20°], [0.74 %, 35°]; 717 mm Hg (19°).

4. Selbstgärung.

Ablesung nach 18 Stdn.: [0.00 %, 20°]; 716 mm Hg (20°). — Nach 66 Stdn.: desgl.

b) Bei $p_H = 3$.

Als Gärsubstrat diente wie bei a) Glucose. Die Puffer-Lösung wurde durch Vermischen von 10 ccm *n*-Essigsäure mit 0.5 ccm *n*-Natronlauge und Auffüllen auf 100 ccm hergestellt.

1. Glucose	I.	II.
Angew. Subst. in % . . .	1.63	1.63
Gef. „ „ % . . .	1.61	1.60
Differenz „ % . . .	—1.2	—1.8

Zu I. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.70 %, 20°]; 716 mm Hg (20°). — Zu II. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.69 %, 20°]; 716 mm Hg (20°).

2. Selbstgärung.

Ablesung nach 24 Stdn.: [0.00 %, 20°]; 716 mm Hg (20°).

Nach obigen Versuchen wird Glucose allein und im Gemisch mit Galaktose in einem p_H -Bereich von 3—3.7 nach 24 Stdn. quantitativ bestimmt. Galaktose wird von Schizosaccharomyces Pombe nicht vergoren. Eine Verlängerung der Versuchsdauer bis zu 66 Stdn. übt keinen Einfluß auf die Resultate aus. Da Schizosaccharomyces Pombe keine Selbstgärung

¹⁶) Die in eckigen Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf die Ablesungen an der 20°- bzw. 35°-Skala.

¹⁷) Die Temperaturen während der Einstellung vor und Ablesung nach der Gärung befinden sich in runden Klammern.

besitzt, ist die Menge des entwickelten Kohlendioxyds von der verwandten Hefemenge unabhängig. Ohne Pufferung oder bei einem $p_H > 3.7$ erhält man mit *Schizosaccharomyces Pombe* keine quantitativen Ergebnisse. So beträgt bei $p_H = 5.5$ (Phosphat-Puffer) der Fehler -13.6% ; bei $p_H \approx 4$ (Acetat-Puffer) entspricht die Abweichung -5.9% vom theoretischen Wert.

Bemerkt sei noch, daß in Übereinstimmung mit van der Haar¹⁸⁾ und E. F. Armstrong¹⁹⁾, aber im Gegensatz zu den Angaben der Lehrbücher von Euler-Lindner²⁰⁾ und A. Klöcker²¹⁾, durch *Schizosaccharomyces Pombe d*-Mannose vergoren wird. Ferner dürfen wir aus systematischen Gründen nicht unerwähnt lassen, daß *Schizosaccharomyces liquefaciens* Osterwalder²²⁾ entgegen dem Befund seines Entdeckers nach 48 Stdn. Galaktose nicht vergärt. Demnach besteht in dieser Hinsicht kein unterschiedliches Verhalten gegenüber *Schizosaccharomyces Pombe*.

Quantitative Bestimmung der Zymo-hexosen und der *d*-Galaktose durch *Saccharomyces cerevisiae*.

Für nachstehende Versuche wurde untergärige Hefe verwandt, die den Reinkulturen der Münchener Löwen-Brauerei entstammt. Hrn. Dr. Bergdolt von der Münchener Löwen-Brauerei, der uns jederzeit bereitwilligst Hefe zur Verfügung stellte, sprechen wir auch an dieser Stelle unseren ergebensten Dank aus.

Die gewaschene und abzentrifugierte Hefe wird in dünner Schicht auf einer Glasplatte ausgebreitet, 24 Stdn. bei Zimmer-Temperatur aufbewahrt und in sterilem Wasser aufgeschlämmt. Für jede Gärung werden 4 Tropfen dieser Aufschlammung aus einer Lohnstein-Pipette verwandt. Als Gärsubstrat dienten Glucose, Galaktose und Gemische der beiden Zucker. Zur Bereitung der Puffer-Lösung werden sekundäres Ammoniumphosphat und primäres Kaliumphosphat im Verhältnis 0.4:9.6 Mol in der Reibschale verrieben. Von dieser Salzmischung wird eine 1-proz. Lösung hergestellt.

1. Glucose.

Angew. Subst. in %	...	1.77
Gef. „ „ %	...	1.75
Differenz „ „ %	...	-1.1

Ablesung nach 18 Stdn.: [1.83 %, 20°], [1.58 %, 35°]; 718 mm Hg (19°).

2. Galaktose.

	I.	II.
Angew. Subst. in %	1.13	1.13
Gef. „ „ %	1.14	1.14
Differenz „ „ %	+0.9	+0.9

Zu I. Ablesung nach 18 Stdn.: [1.19 %, 20°], [0.99 %, 35°]; 718 mm Hg (19°). — Zu II. Ablesung nach 5 1/2 Stdn.: [0.20 %, 20°], [0.17 %, 35°]; 727 mm Hg (17°). — Die Menge der vergorenen Galaktose beträgt 0.19 %. — Ablesung nach 24 Stdn.: [1.17 %, 20°], [1.03 %, 35°]; 727 mm Hg (17°).

3. Glucose-Galaktose-Gemisch.

	I.	II.
Angew. Subst. in %	1.45	1.45 (0.88 Glucose, 0.57 Galaktose)
Gef. „ „ %	1.45	1.50
Differenz „ „ %	± 0.00	+ 3.45

¹⁸⁾ l. c., S. 113.

¹⁹⁾ C. 1905, II 1807.

²⁰⁾ l. c., S. 51.

²¹⁾ l. c., S. 295.

²²⁾ Ztrbl. f. Bakteriologie usw., II. Abt. 66, 228 [1926].

Zu I. Ablesung nach 18 Stdn.: [1.51 %, 20°], [1.32 %, 35°]; 718 mm Hg (19°). —
 Zu II. Ablesung nach 5½ Stdn.: [1.46 %, 20°], [1.23 %, 35°]; 727 mm Hg (17°).

Die Menge des vergorenen Glucose-Galaktose-Gemisches beträgt 1.43 %.

Ablesung nach 24 Stdn.: [1.54 %, 20°], [1.30 %, 35°]; 727 mm Hg (17°).

4. Selbstgärung.

Ablesung nach 18 Stdn.: [0.00 %, 20°]; 718 mm Hg (19°). — Nach 24 Stdn.:
 [0.00 %, 20°]; 727 mm Hg (17°).

Nach obigen Ergebnissen werden Zymo-hexosen und Galaktose mittels Löwenbräu-Hefe, deren Selbstgärung zuvor beseitigt ist, bei $p_H = 5.5$ (Phosphat-Puffer) nach 24 Stdn. quantitativ bestimmt. Unter den gleichen Bedingungen ist die quantitative Gärung der Galaktose allein innerhalb 18 Stdn. beendet, während die Gärung der Galaktose im Gemisch mit Glucose (vergl. Vers. 3, II) wesentlich beschleunigt wird. So ist nach 5½ Stdn. Galaktose allein (vergl. Vers. 2, II) zu 16.8 %, bei Gegenwart von Glucose zu etwa 96 % umgesetzt.

Bei einem $p_H > 5.5$ erhält man mit zuvor ausgebreiteter Löwenbräu-Hefe unbrauchbare Werte. Frische Hefe vermag zwar Galaktose innerhalb 20—30 Stdn. zu vergären, aber die nach 7 Stdn. einsetzende Selbstgärung fälscht die Resultate, und es ist nicht möglich, den Endpunkt der Gärung festzustellen.

Aus systematischen Gründen möchten wir nicht unerwähnt lassen, daß entgegen den Angaben von F. Lafar²³⁾ und in Übereinstimmung mit A. J. Kluyver und E. F. Armstrong *Saccharomyces exiguus d-Mannose* vergärt.

III.

Die Hemi-cellulosen (H_S) werden aus den Skelettsubstanzen von Fichte (*Picea excelsa*) bzw. Flachs (*Linum usitatissimum*) in der bereits beschriebenen Weise dargestellt²⁴⁾. An Stelle der früher angegebenen mehrmaligen Alkali-Behandlung der Skelettsubstanzen genügt eine einmalige, wenn dieselben nach der ersten Einwirkung von 5-proz. Natronlauge zwischen Porzellanplatten stark abgepreßt werden. Bei dieser Arbeitsweise erhält man nach der zweiten Alkali-Behandlung nur noch geringe Hemi-cellulose-Mengen. Man vermeidet auf diese Weise die Aufarbeitung mehrerer Hemi-cellulose-Fractionen, die verschiedenartig zusammengesetzt sein können.

Neuerdings bevorzugen wir, die in Soxhlet-Hülsen abfiltrierten Hemi-cellulosen zunächst 12 Stdn. in einem Becherglas mit Alkohol aufzubewahren. Hierdurch entfernt man bei gewöhnlicher Temperatur die Hauptmenge der Essigsäure durch Dialyse. Erst dann werden die Hemi-cellulosen mit siedendem Alkohol bzw. Äther behandelt. In Übereinstimmung mit früheren Angaben²⁵⁾ beträgt die Ausbeute an Hemi-cellulosen (H_S) von Flachs 15 %, bezogen auf die Skelettsubstanz. Aus der wasser- und asche-freien Skelettsubstanz der Fichte erhält man 13.1 % wasser- und asche-freie Hemi-cellulosen (H_S). Der Asche-Gehalt von H_S (getrocknet) aus Fichte beträgt 3.7 %.

Für die präparative Darstellung der Skelettsubstanzen ist das früher angegebene Reinigen der Pflanzenfasern mit Benzol²⁶⁾ bzw. Wasser-

²³⁾ F. Lafar, Handbuch der Technischen Mykologie (G. Fischer, Jena 1905/07), IV. Band, S. 398.

²⁴⁾ E. Schmidt und E. Graumann, B. 54, 1867 [1921].

²⁵⁾ E. Schmidt, W. Haag und L. Sperling, B. 58, 1402 [1925].

²⁶⁾ B. 54, 1864 [1921].

Aceton vor dem Aufschluß unnötig, da Harze usw. zugleich mit den Inkrusten durch Chlordioxyd-Natriumsulfit entfernt werden. Nach 7—9-maliger Behandlung mit diesen Reagenzien ist der Aufschluß des Fichtenholzes beendet, und die erhaltene Skelettsubstanz erweist sich nach dem Lagerversuch als inkrusten-frei. In Übereinstimmung mit früheren Angaben²⁷⁾ verhält sich die inkrusten-freie Skelettsubstanz von Fichte innerhalb 1% beständig gegenüber erneuter Einwirkung von Chlordioxyd-Natriumsulfit.

Angew. Skelettsubstanz	0.4592 g
Gef. „	0.4572 g
Differenz in %	—0.44

Der Asche-Gehalt der Skelettsubstanz beträgt 0.29%.

Für quantitative Bestimmungen der Skelettsubstanzen bzw. der Inkrusten, die in der früher beschriebenen Weise²⁸⁾ ausgeführt werden, muß das angewandte Holz zuvor durch Behandeln mit Wasser und Aceton²⁹⁾ von Extraktivstoffen befreit werden.

Gemahlene und gesiebte Sägespäne werden bei Zimmer-Temperatur etwa 8 Stdn. zunächst mit destilliertem Wasser, alsdann mit 60-proz. Aceton, endlich mit reinem Aceton je 24 Stdn. unter häufigem Umschütteln aufbewahrt. Nach der 6. Aceton-Behandlung entspricht die Menge der Extraktivstoffe nur noch 0.01% des Holzes. Der Asche-Gehalt des so gereinigten Fichtenholzes beträgt 0.17%.

	I.	II.
Angew. Fichtenholz	0.6385 g ³⁰⁾	0.7127 ³⁰⁾
Gef. Skelettsubstanz	0.4061 g ³⁰⁾	0.4579 ³⁰⁾
„ % Skelettsubstanz	63.60	64.25
mithin % Inkruste	36.40	35.75

Demnach sind in dem untersuchten Fichtenholz durchschnittlich:

63.9% Skelettsubstanz und
36.1% Inkruste

enthalten.

Quantitative Hexosen-Bestimmungen in den Hemi-cellulosen H₅ von:

I. Flachs (*Linum usitatissimum*).

a) mittels *Schizosaccharomyces Pombe*, p_H = 3.7.

Angew. Sbst.: 0.4734 g ³¹⁾ .	I.	II.
Gef. Sbst.	0.1070 g	0.1070 g
„ % Hexosen	22.60	22.60

Mittelwert: **22.60%** Hexosen.

Zu I und II. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.13%, 20°], [0.97%, 35°]; 720 mm Hg (21°).

Selbstgärung. Ablesung nach 24 Stdn.: [0.00%, 20°]; 720 mm Hg (21°).

b) mittels *Saccharomyces cerevisiae*, p_H = 5.5.

Angew. Sbst.: 0.5135 g ³²⁾ .	I.	II.	III.	IV.
Gef. Sbst.	0.1160 g	0.1170 g	0.1130 g	0.1180 g
„ % Hexosen	22.59	22.79	22.01	22.98

Mittelwert: **22.59%** Hexosen.

²⁷⁾ E. Schmidt und G. Malyoth, B. 57, 1836 [1924].

²⁸⁾ E. Schmidt und E. Graumann, B. 54, 1871 [1921].

²⁹⁾ B. 58, 1401 [1925]. ³⁰⁾ Unter Berücksichtigung des Asche-Gehalts.

³¹⁾ Ohne Berücksichtigung des Asche-Gehalts.

Zu I. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.22 %, 20°]; 716 mm Hg (20°). — Zu II. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.23 %, 20°]; 716 mm Hg (20°). — Zu III. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.21 %, 20°], [1.03 %, 35°]; 719 mm Hg (22°). — Zu IV. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.26 %, 20°], [1.08 %, 35°]; 719 mm Hg (22°).

Selbstgärung. Ablesung nach 24 Stdn.: [0.00 %, 20°]; 719 mm Hg (22°).

Aus der Übereinstimmung der Werte unter a) und b) folgt, daß Galaktose am Aufbau der Hemi-cellulosen H_3 von Flachs nicht beteiligt ist.

2. Fichte (*Picea excelsa*).

a) mittels *Schizosaccharomyces Pombe*, $p_H = 3.7$.

Angew. Subst.: 0.3476 g ³²⁾ .	I.	II.
Gef. Subst.	0.1550 g	0.1550 g
„ % Hexosen	44.88	44.88
Mittelwert: 44.88 % Hexosen.		

Zu I und II. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.64 %, 20°], [1.43 %, 35°]; 714 mm Hg (19°).

b) mittels *Saccharomyces cerevisiae*, $p_H = 5.5$.

Angew. Subst.: 0.3226 g ³²⁾ .	I.	II.
Gef. Subst.	0.1500 g	0.1470 g
„ % Hexosen	46.50	45.57
Mittelwert: 46.03 % Hexosen.		

Zu I. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.58 %, 20°]; 716 mm Hg (20°). — Zu II. Ablesung nach 24 Stdn.: [1.55 %, 20°]; 716 mm Hg (20°).

Aus der Übereinstimmung der Werte unter a) und b) folgt, daß Galaktose am Aufbau der Hemi-cellulosen H_3 der Fichte nicht beteiligt ist. Die Differenz der Werte unter a und b beträgt 2.5 %, liegt demnach innerhalb der für die Gärmethode ermittelten analytischen Fehlergrenze (vergl. S. 264I).

423. Aristid v. Grosse: Über Rubidium- und Caesium-alkyle.

[Aus d. Anorgan.-chem. Institut d. Techn. Hochschule zu Berlin.]

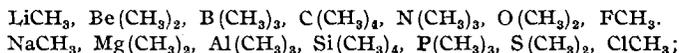
(Eingegangen am 8. Oktober 1926.)

Während alle Elemente, außer den Edelgasen, Halogenide oder Oxyde bilden, existieren Alkylverbindungen nur von ungefähr einer Hälfte der Elemente. Vor kurzem¹⁾ wurde die Fähigkeit, typische „Elementalkyle“²⁾ zu bilden — fußend auf der Regelmäßigkeit und großen Periodizität in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften, insbesondere der Valenz —, mit dem normalen Elektronenbau der alkylbildenden Elemente in Zusammenhang gebracht.

³²⁾ Unter Berücksichtigung des Asche-Gehalts. Die zur Analyse verwandte Substanz, die der Hemi-cellulosen-Fraktion I (vergl. B. 58, 1401, Abschnitt III, 3 [1925]) entstammt, ergab 2.6 % unhydrolysierbare Anteile.

¹⁾ A. v. Grosse, Z. a. ch. 152, 133 [1926].

²⁾ Als typische „Elementalkyle“ werden Verbindungen von der Formel Ey , wo y die höchste Alkylvalenz bedeutet, bezeichnet. Als Beispiele mögen die folgenden Reihen angeführt werden:



siehe auch l. c., S. 137.