

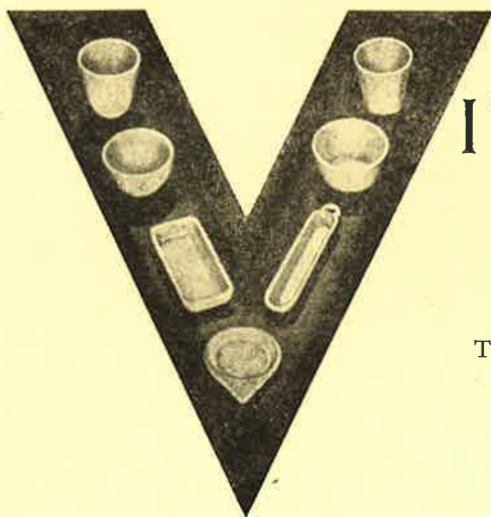
FINSKA SUOMEN
KEMISTSAMFUNDETS KEMISTISEURAN
MEDDELANDEN TIEDONANTOJA

REDAKTÖR — TOIMITTAJA

Harald Nyberg

INNEHÅLL — SISÄLTÖ

Jacobus Sundman: Kurt Buch 75 år	33
Nils-Erik Saris: Pathways of Biological Nitrate Reduction	36
Tor-Magnus Enari: Om riboflavinproduktion hos mikro-organis- mer (<i>On the Production of Riboflavin by Micro Organisms</i>)	47
T. E. Brehmer: Om utbytet mellan faserna i systemet Cu-metal/Ag- lösning (<i>On the Exchange between Phases in the Arrangement Cu-Metal/Ag- Solution</i>)	55
B. V. Enüstün: On Hydrolysis Equilibrium	59
Rolf Uggla: Manometric Determination of Carbon Dioxide with Soda Asbestos	61
Kemiska Sällskapets i Åbo verksamhet	63
Notiser — Uutisia	64



VITREOSIL

Ren smält

Vitreosil-laboratoriekvarts

Innehåller över 99.8 SiO₂

THE THERMAL SYNDICATE Ltd.

England

Generalagent

HAVULINNA Oy

Laboratorieavdelningen

Helsingfors, Berggatan 16, tel. 61 451, interurb. A 8415

Finska Kemistsamfundets Meddelanden

Annonspris		Prenumerationspris	
på annonsidor	8.000:—	i Finland	400:—
på sidor mot text	10.000:—	till utlandet	500:—
på bakpärmen	10.000:—		

Annons- och prenumerationsärenden

Fil.mag. B. C. Fogelberg

Centrallaboratorium Ab S. Hesperig. 4. tel. 44 01 01, 67 10 19

Suomen Kemistiseuran Tiedonantoja

Ilmoitushinnat		Tilaushintat	
ilmoitussivuilla	8.000:—	Suomessa	400:—
tekstin vastaisella sivulla	10.000:—	Ulkomailla	500:—
takakannessa	10.000:—		

Ilmoitus- ja tilausasiat

Fil.maist. B. C. Fogelberg

Oy Keskuslaboratorio E. Hesperiank. 4. puh. 44 01 01, 67 10 19

FINSKA SUOMEN KEMISTSAMFUNDETS KEMISTISEURAN MEDDELANDEN TIEDONANTOJA

65 årg.

1956 N:o 2

65 vuosik.

Utgiven av — Julkaisija
Finska Kemistsamfundet — Suomen Kemistiseura
Styrelse — Hallitus

JACOBUS SUNDMAN — MAGNUS ALFTHAN — TERJE ENKVIST
J. GRIPENBERG — CH. GUSTAFSSON — WALDEMAR JENSEN
OLOF JERNSTRÖM — GÖSTA SILÉN

Sekreterare — Sihteeri

PER FALCK, Eriksgatan 44 B Eerikinkatu, tel 24 455 puh

Kassör — Rahastonhoitaja

B. C. FOGELBERG: S. Hesperigatan 4 E. Hesperiankatu
tel 44 01 01, 67 10 19 puh

Arkivarie — Arkistonhoitaja

NITA GRÖNVIK, S. Hesperigatan 4 E. Hesperiankatu tel 44 01 01, 44 73 99 puh

Redaktör — Toimittaja

HARALD NYBERG, Parkgatan 7 a A Puistokatu tel 61 768, 62 47 00 puh

Kurt Buch 75 år



När Finska Kemistsamfundet vid sitt möte den 5 maj 1951 enhälligt beslöt att till sin hedersledamot kalla professor Kurt Buch stod det i mycket god samklang med § 3 i Samfundets

stadgar där det säges att till hedersledamöter i Samfundet kunna utses personer, vilka inlagt synnerligen stora förtjänster om kemin eller dess praktiska tillämpning. Som alla i denna krets känner till är det främst havsforskningen med alla härtill anslutande kemiska problem som fångat professor Buchs intresse. Han insåg redan på ett tidigt stadium den grundläggande betydelsen av pH-begreppet. Redan år 1910 finner man i Samfundets Meddelanden en publikation beträffande bestämning av vätejonkoncentrationen enl. Sörensen och egna bestämningar av vätejonkoncentrationen i havsvatten. Vätejonkoncentrationen har också vid sidan av kolsyran intagit en central ställning i professor Buchs forskning. Dessa temata behandlades vidlyftigt i den 1918 publicerade doktorsavhandlingen »Über die Alkalinität, Wasserstoffionen-Konzentration, Kohlensäure und Kohlensäure-tension in Wasser der Finland umgebenden Meere» och har sedermera kompletterats med nya undersökningar och utvidgats genom forskningsresor bl.a. till Norra Ishavet och Atlanten. Att prof. Buchs forskningsresultat vunnit erkännande runt om i världen visas bl.a. av att han inbjudits som föreläsare till Förenta Staternas oceanografiska institut.

Tack vare professor Buchs beredvillighet att ställa sig till förfogande som föredragshållare har Finska Kemistsamfundets medlemmar haft förmånen att så att säga vara med om alla dessa forskningar. Vi är tacksamma för alla de förhandsmeddelanden vi fått höra och som vi senare i färdigt skick kunnat läsa i publikationerna. Vi har varit glada att få del av de stora linjerna och av de spekulationer resultaten givit anledning till. Från senare år minns jag särskilt föredraget vid Nordiska Kemistmötet i Helsingfors som behandlade »Kolsyran i atmosfären, industrins kolsyraproduktion och klimatet» där man medryckande fick höra huru den mänskliga verksamheten förändrar klimatet på vår jord. För sina publikationer i Samfundets Meddelanden har professor Buch två gånger erhållit Alfthanska priset, nämligen 1937 för en undersökning beträffande den kemiska undervisningen vid amerikanska högskolor samt 1946 tillsammans med sin elev dr Koroleff för Jämviktsstudier rörande bly och alkaliditizoner.

Inom Finska Kemistsamfundets styrelse har prof. Buch varit verksam i flere olika repriser, så skötte han under treårsperioden 1923—25 det maktpåliggande värvet av kombinerad sekreterare och redaktör, 1926 var han viceordförande och 1927 ordförande. År 1943 valdes prof. Buch ånyo till viceordförande och året därpå till ordförande varefter han kvarstod i styrelsen ända till 1951 då han som nämnt kallades till hedersledamot. Bland professor Buchs förtroendeuppdrag inom samfundet kunde förutom medlemskap i Centralrådet för Finlands kemister särskilt framhållas att prof. Buch 1945 utsågs till samfundets represen-

tant i den kommitté som tillsammans med representanter för Suomalaisten Kemistien Seura skulle dryfta möjligheterna av en gemensam nordisk kemisk tidskrift. Resultatet blev som vi alla vet en av milstolparna i det nordiska samarbetet på kemins område, Acta Chemica Scandinavica. Prof. Buch invaldes 1947 i redaktionen för denna tidskrift.

Jag har här främst försökt ge en bild av prof. Buchs verksamhet inom samfundet och har icke närmare ingått på hans verksamhet som lärare — först som professor vid Åbo Akademi under åren 1934—42 och sedan dess vid Helsingfors Universitet. Vare det dock sagt att han genom trivseln kring sin person haft alldeles särskilda förutsättningar att ge sin lärdom en lockande och entusiasmerande gestalt. Genom sina för sin ålder sällsynta kroppskrafter och sin andliga vitalitet har han även under de sju år som gått sedan han blev emeritus kunnat dela med sig av den visdom han samlat under ett långt liv som aktiv forskare. Med glädje har jag erfarit att studenterna även instundande höst kommer att få del av professor Buchs livfulla och av försynt humor präglade föreläsningar.

När Kemistsamfundets styrelse diskuterade formerna för uppvaktning vid 75-årsdagen föll det sig helt naturligt att det icke skulle bli någon opersonlig adress eller minnesgåva utan att det var den levande människan och den gode kamraten vi ville hylla. Vi ville ha honom hos oss en kväll som så ofta förut, för att själva kunna framföra våra gratulationer.

Jacobus Sundman

Pathways of Biological Nitrate Reduction

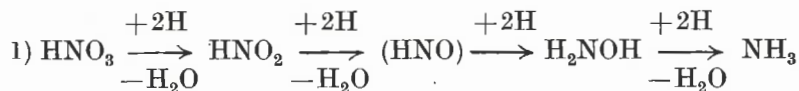
Nils-Erik Saris

Laboratory of the Foundation for Chemical Research, Biochemical Institute, Helsinki, Finland

Nitrate reduction is an important process in Nature. It can be performed by a variety of organisms: bacteria, yeasts, molds, and green plants. What is the mechanism of this reduction?

The main pathway of nitrate reduction. It is evident that nitrate cannot be reduced to ammonia in one step. Intermediate products have to be formed in which nitrogen is in a more reduced state than in nitrate. These intermediate compounds need not accumulate but may be reduced quickly enough to escape detection. Anyway it should be possible to write schemes for partial reactions of nitrate reduction just as for any chemical reaction.

In biological reductions and oxidations two protons and electrons are usually added to, or removed from, the substrate in a single step. If this principle is applied to nitrate reduction, nitrite constitutes the first intermediate, the next step leading to a hypothetical compound (HNO), while hydroxylamine would be formed in the subsequent step and ammonia in the last step:



Do experimental results support this pathway of nitrate reduction? Has it been shown that these compounds are formed as intermediates in nitrate reduction?

Nitrite is almost always formed in nitrate reduction. Added nitrite is rapidly reduced which shows that nitrite really is an intermediate in nitrate reduction.

Hydroxylamine or organic hydroxylamine compounds are sometimes accumulated in nitrate reduction but only in negligible amounts. This accumulation is often only temporary, the hydroxylamine disappearing rapidly. This is the case in *Torulopsis utilis* yeast (1). In the mold *Fusarium lini* a positive test for hydroxylamine could be obtained in the culture solution only during the first days after inoculation (2). In a number of bacteria reducing nitrate or nitrite, hydroxylamine could be

detected in the culture medium only a few minutes after the last traces of nitrite were reduced (3). Added hydroxylamine was rapidly reduced by some bacteria (3, 4, 5). In some other organisms such as the mold *Aspergillus niger* (6), the yeast *Torulopsis utilis* (1), and green plants (7), the toxicity of added hydroxylamine prevented its reduction. In nitrate reduction the concentration of hydroxylamine never rises to a toxic level. The toxicity of hydroxylamine does not therefore rule it out as an intermediate. As a whole the evidence in favour of the view that hydroxylamine is an intermediate in nitrate reduction is convincing.

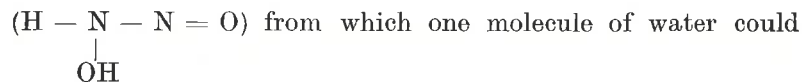
During the last few years enzymatic studies have finally proved the above mentioned pathway in nitrate reduction to be the main one. Numerous enzymes reducing nitrate to nitrite have been found. From various bacteria (8-11), from the mold *Neurospora*, and from Soya-leaves (12) enzymes capable of reducing nitrite to hydroxylamine or hydroxylamine to ammonia have been extracted.

The only obscure point in this pathway is the nature of the hypothetical intermediate (HNO). No such intermediate has ever been found. There has therefore been free scope for speculations. According to older hypotheses (13, 14), this intermediate is nitroxyl (H - N = O).

Denitrification. The intermediate (HNO) is of great theoretical importance because it is the key intermediate where the pathway of denitrification departs from the main pathway of nitrate reduction. Virtanen (15) recently reported interesting experiments in which a halotolerant micrococcus which reduced nitrate to ammonia (9) had changed into a denitrifying organism. The reduction of nitrite to hydroxylamine was found to be impaired in the denitrifying micrococcus. Virtanen thinks that the enzyme reducing the intermediate (HNO) to hydroxylamine is lost. As a consequence (HNO) accumulates and spontaneously forms N_2O . According to Virtanen (15), the intermediate (HNO) is a radical (= NOH) from which N_2O is formed through a reaction between two radicals with the splitting off of one molecule of water:



Allen and van Niel (16) found nitramide ($\text{O}_2\text{N-NH}_2$) to be readily converted to denitrification products by cell-free extracts of denitrifying bacteria. They claimed nitramide to be an intermediate in denitrification. These authors also found nitrous oxide to be reduced to molecular nitrogen. Kluyver (17) thinks nitramide to react in the tautomer form of imido-nitric acid



easily be split. Imidonitric acid could be formed through dimerization of the hypothetical HNO (nitroxyl). Hyponitrous acid is ruled out as the dimerization product as it cannot serve as a substrate for denitrification (16). It is not yet possible to decide whether denitrification products arise directly from the intermediate HNO or *via* dimerization to imido-nitric acid.

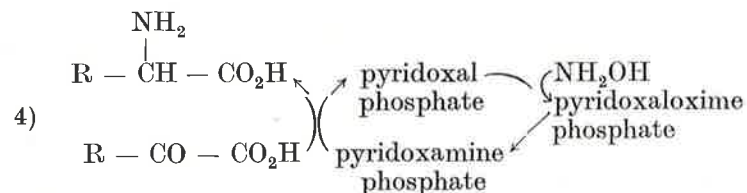
Other mechanisms for the formation of a N - N-bond have been suggested but have not gained much support. A reaction between nitrite and hydroxylamine could give gaseous products. However, hydroxylamine is not formed in denitrification. The reaction between nitrite and amino-N with the formation of molecular nitrogen is negligible in that pH region in which denitrification occurs.

Steinberg (6) suggested that nitrite is reduced in its dimer form. Nitrohydroxylaminic acid $\text{O}_2\text{N} - \text{NHOH}$ and nitramid would then be formed as intermediates. Nitrohydroxylaminic acid was readily utilized by *Aspergillus niger* (6) but not by denitrifiers (16).

The nature of the reducing enzymes. In all cases studied the reducing enzymes were inhibited by reagents for heavy metals such as cyanide, 8-oxiquinolinol, and phenanthroline. In molds molybdenum is a constituent of nitrate reductase (18). Usually the nitrate, nitrite, and hydroxylamine reductases studied have been found to be metalloflavoproteins (12). In the halotolerant micrococcus mentioned above the hydroxylamine reductase contains iron and may be a cytochrome enzyme (9). Hemoglobin is able to decompose hydroxylamine to ammonia and gaseous products catalytically. In the presence of hydrogen donors only ammonia is formed (19). Reduced pyridine nucleotides are effective hydrogen donors in nitrate reduction. In *Bacillus subtilis* the reduction of hydroxylamine has been demonstrated to be reversible:



In the mold *Neurospora* pyridoxal phosphate was found to be connected with nitrite reduction in some way. Silver and McElroy (20) suggested a cyclic reaction sequence in which the coenzyme reacts with hydroxylamine to form pyridoxaloxime phosphate which then is reduced to pyridoxamine phosphate. In a transamination reaction the amino group is transferred to a keto acid by which an amino acid is formed and pyridoxal phosphate is regenerated:



Silver and McElroy have not been able to obtain any conclusive evidence in favour of this interesting hypothesis. Added pyridoxaloxime phosphate was not reduced but it did support growth in pyridoxine-requiring mutants.

Nitrate reduction in plants. In plants nitrate is reduced by two mechanisms. There is a definite nitrate reduction in the dark, but on exposure to light nitrate reduction in the leaves is greatly increased. This has led many authors (21) to suppose that nitrate can replace carbon dioxide in van Niel's general formula of photosynthesis:



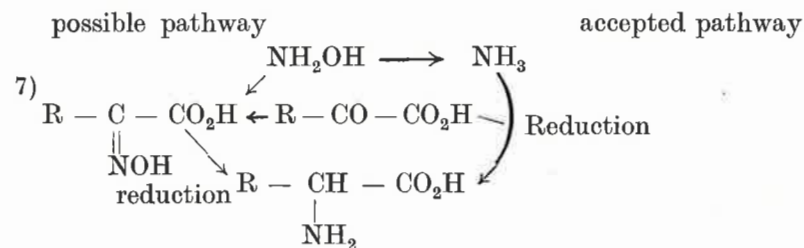
Evans and Nason (22) have demonstrated the reduction of nitrate when grana from soya leaves are illuminated in the presence of triphosphopyridine nucleotide (TPN). According to them the first step is the formation of reduced pyridine nucleotide which is one of the initial reactions in photosynthesis (23):



Nitrate is then reduced enzymatically with reduced pyridine nucleotide acting as hydrogen donor. The effect of illumination on nitrate reduction is thus due to the increase in the amount of reduced pyridine nucleotide brought about by photoreactions.

2,4-dinitrophenol is a substance which uncouples oxidative reactions from phosphorylation. It prevents the formation of energy-rich phosphates, and therefore inhibits energy-requiring reactions in the cell. It does not influence nitrate reduction to nitrite in plants (24), but the reduction of nitrite is completely inhibited. Obviously some energy-rich compound, such as adenosine triphosphate, is required in the further reduction of nitrite in plants. According to Stoy (25), the difference between nitrate reduction in darkness and in light in plants lies in the way in which energy and the carbon compounds into which the nitrogen is assimilated are supplied. In light the reduction is photochemical, and chlorophyll and a yellow pigment — presumably a flavin — are active in the transfer of energy. In the dark respiration is the driving force.

Formation and significance of organic hydroxylamine compounds in the reduction of nitrate. As Professor A. I. Virtanen's assistant the author has studied only one step in the pathway of nitrate reduction, i.e. the reduction of hydroxylamine to ammonia. Hydroxylamine is a very reactive compound which rapidly forms oximes from keto compounds. This has made some scientists (Virtanen (26), Endres (27), Wirth (2)) consider the possibility that hydroxylamine could be partly reduced in »bound» form:



In living cells α -keto acids, such as pyruvic acid, α -keto-glutaric acid, and oxalacetic acid, are important metabolites. After oximation and reduction of oximino acids, alanine, glutamic acid, and aspartic acid which are central amino acids in amino acid metabolism would be found. The work of Maurer (28), who found alanine in actively fermenting cultures of brewer's yeast to which the oxime of pyruvic acid had been added, was quoted as evidence for the existence of such a pathway. However, many unphysiological compounds are reduced by fermenting yeast (29), and therefore it is not possible to draw any generalized conclusions from Maurer's experiment. When repeating this experiment a reduction of a part of the oxime of pyruvic acid could be demonstrated. Paper chromatograms of the culture solution showed it to contain traces of all amino acids of yeast, but alanine was in no way predominant. This was to be expected, as the yeast was able to utilize as a source of nitrogen any alanine formed from oxime.

Other evidence favouring the concept of a pathway in nitrate reduction involving the reduction of oximes was the temporary accumulation of »bound» hydroxylamine in *Fusarium lini* (2) and *Torulopsis utilis* (1). Professor Virtanen gave the author the task to identify the hydroxylamine compounds formed in these organisms and to estimate the fraction of nitrate reduced via the oxime pathway.

When repeating Wirth and Nord's (2) experiments using the same strain of *Fusarium lini* no hydroxylamine was formed, nor was the mold able to utilize added oxime of pyruvic acid. The efforts to repeat Virtanen and Csáky's (1) experiments failed at

first, but then extremely nitrogen deficient *Torulopsis utilis* yeast (N % of dry mass less than 4 %) was found to behave as the yeast in Virtanen and Csáky's (1) experiments. Hydroxylamine compounds were also formed from nitrite (50–100 $\mu\text{gN/ml}$). Of the bound hydroxylamine 50–70 % was reducible and thus



Fig. 1. A and B. Analysis of the oximes of keto acids formed in *Torulopsis utilis* in nitrite reduction. The amino acids in the extract were removed before the oximes are reduced to amino acids. These are chromatographed in two-dimensional chromatograms using butanol : acetic acid : water and phenol : water : ammonia as solvents.

- A. Control showing that all amino acids were removed before reduction.
- B. In the reduction alanine (2), glutamic acid (17), and serine (8) were formed. These amino acids correspond to the oximes of pyruvic acid, α -ketoglutaric acid, and hydroxypyruvic acid.
- C and D show an analysis of the keto acid in the same yeast. The keto acids are converted to 2,4-dinitrophenylhydrazones which are purified, reduced to the corresponding amino acids and chromatographed.
- C. Control showing that a trace of serine was present before reduction.
- D. In the reduction alanine, glutamic acid, and serine were formed.

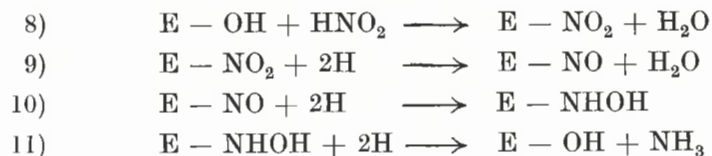
consisted of oximes, mainly those of pyruvic acid and α -ketoglutaric acid (30), though oximes of hydroxypyruvic acid and glyoxylic acid were sometimes found.

These oximes were reduced to the corresponding amino acids which were identified by paper chromatography (30, 31). The proportions of the different oximes formed corresponded rather well to the proportions of the keto acids in the yeast (Fig. 1). The keto acids were identified by a procedure developed by Alfthan (32) in which the 2,4-dinitro-phenylhydrazones of keto acids are reduced to the corresponding amino acids.

The non-reducible fraction of the «bound» hydroxylamine formed in *Torulopsis utilis* was identified as acetylhydroxamic acid (33). It arises through a spontaneous reaction between hydroxylamine and acetyl compounds such as acetylphosphate (34) and acetylcoenzyme A (35).

When studying the disappearance of hydroxylamine compounds from the yeast it was observed that a considerable part ($1/2$) of the bound hydroxylamine in the cells had leaked into the culture solution. Acetylhydroxamic acid was hindered by permeability barriers to reenter the cells. Added acetylhydroxamic acid or oxime of pyruvic acid did not disappear at all or only in negligible amounts from yeast cultures. The yeast was unable to use these hydroxylamine compounds as a source of nitrogen in growth experiments of one week's duration. Nor could any enzyme preparations active in reduction of these hydroxylamine compounds be obtained from the yeast. It was concluded that the bound hydroxylamine arises as a by-product of nitrate reduction. Some of the hydroxylamine leaks out of the reducing system and is trapped by keto acids and other hydroxylamine acceptors. This raises the question why hydroxylamine compounds are formed only in more or less extreme circumstances, e. g. when the yeast is extremely deficient in nitrogen or the concentration of nitrite is quite high. A possible explanation would be that the nitrate reducing system is so well organized that no hydroxylamine accumulates. In this system hydroxylamine reductase might be the only hydroxylamine acceptor present.

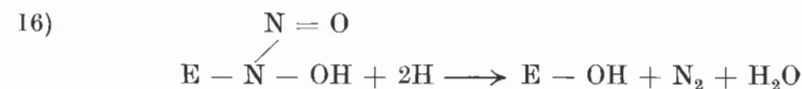
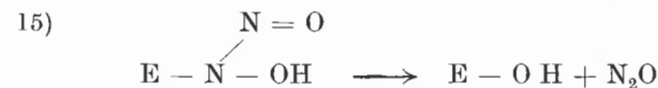
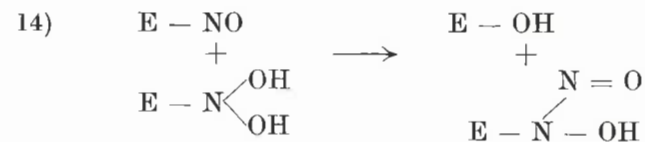
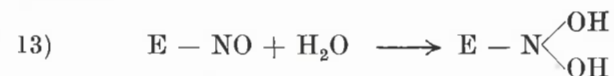
An alternative explanation can be offered. Nitrite is perhaps reduced without the formation of free hydroxylamine as an intermediate. Nitrogen might be bound to enzyme and carrier molecules all the time:



In this reaction sequence reaction 8 might be rate limiting. When the concentration of nitrite is increased some other reaction might become rate limiting. If this were reaction 11, $\text{E} - \text{NHOH}$ would accumulate and a side reaction 12 might lead to free hydroxylamine. If reaction 12 were reversible, free hydroxylamine could be reduced in this system:



If reaction 10 were blocked, following reactions could be written:



As long as a simple hypothesis accounts for the known facts it is unnecessary to advance a complicated scheme for nitrate reduction. A reaction sequence like the one shown above is rather involved and difficult to test experimentally. It is, however, important to remember that the reduction of nitrite to hydroxylamine might proceed without the formation of simple «free» nitrogen compounds as intermediates. In this connection Yamashina's (37) work may be mentioned. From a bacterium he extracted enzymes which reduced aromatic nitro compounds to amino compounds *via* nitroso and hydroxylamine compounds. Similar compounds might be the true intermediates in nitrite reduction.

Formation of hydroxylamine compounds in other organisms. Virtanen (36) demonstrated the formation of «bound» hydroxylamine from nitrate in plants. When analyzing the hydroxylamine compounds formed in rye in nitrite reduction the author could identify oximes of keto acids. The oxime of glyoxylic acid was formed in the greatest amounts, Fig. 2.

In *Azotobacter*, *Aspergillus niger* and a strain of *Nocardia*, isolated by the author from greenhouse soil, hydroxylamine

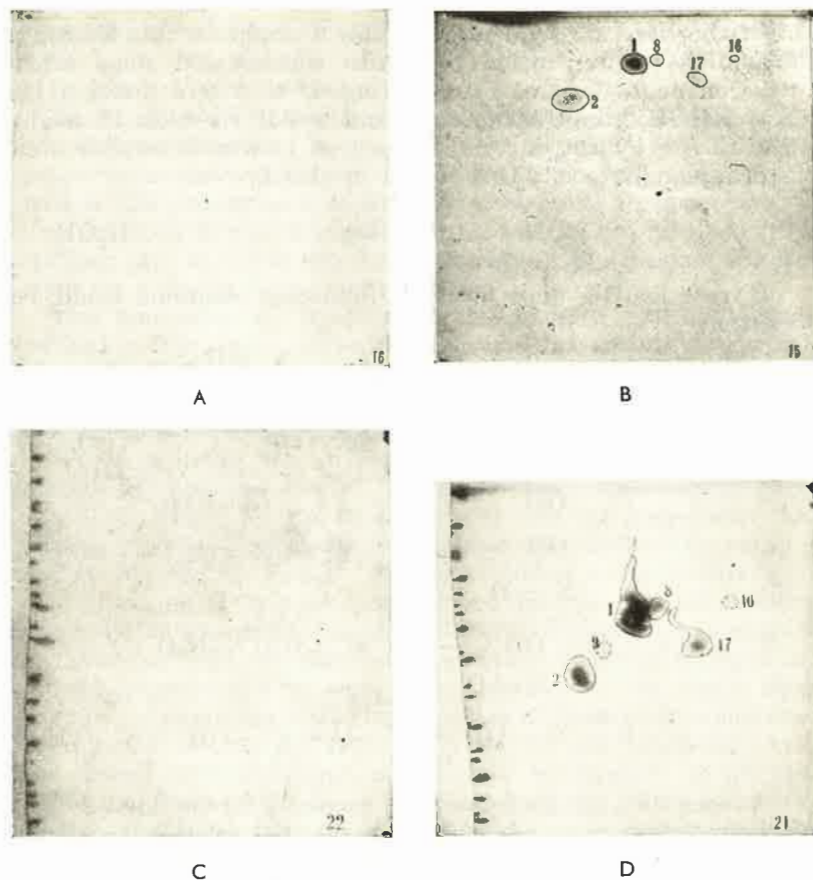


Fig. 2. A and B. Analysis of the oximes of keto acids formed in the roots of rye plants reducing nitrite.
 A. Control showing that no amino acids were present before reduction of oximes.
 B. In the reduction glycine (1), alanine (2), serine (8), glutamic acid (17), and aspartic acid (16) were formed. These amino acids correspond to the oximes of glyoxalic acid, pyruvic acid, hydroxypyruvic acid, α -keto-glutaric acid, and oxalacetic acid respectively.
 C and D. Analysis of the keto acids of rye roots.
 C. Control showing that no amino acids were present before reduction.
 D. In the reduction of dinitrophenylhydrazones glycine, alanine, serine, glutamic acid, and traces of aspartic acid and threonine (9) were formed.

compounds of quite another type were found. These compounds contain amino groups and are presumably peptides. Purified fractions seem to contain hydroxylamine compounds which are not typical oximes or hydroxamic acids. They give no reaction for hydroxamic acid and still only half of the hydroxylamine disappears upon reduction with sodium amalgam in conditions

under which oximes are reduced quantitatively. The study of these compounds is now in progress.

Summary

This paper is a lecture delivered before the meeting of Finska Kemistsamfundet (Finnish Chemical Society) on March 26, 1956. The author gives a review of current hypotheses regarding the pathway of nitrate reduction and denitrification and of recent advance in this field. In the main pathway of nitrate reduction, nitrate is reduced to ammonia *via* nitrite and hydroxylamine. In denitrifying organisms this pathway is blocked before hydroxylamine. As a consequence, nitrogen is diverted to a pathway leading to the formation of molecular nitrogen and nitrous oxide. The mechanism of the formation of these gaseous products is still obscure. The author also reviews his studies on the formation of organic hydroxylamine compounds in different organisms. In *Torulopsis utilis* oximes of keto acids and acetylhydroxamic acid are formed. These compounds cannot be used as a source of nitrogen by the yeast. They seem to be insignificant byproducts of nitrate reduction. Also in rye seedlings oximes of keto acids are formed in nitrate reduction, but in *Aspergillus niger*, *Azotobacter*, and a strain of *Nocardia* hydroxylamine compounds containing amino groups are found.

Literature

1. Virtanen, A. I. and Csáky, T. Z. *Nature* **161** (1948) 814.
2. Wirth, J. C. and Nord, F. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1** (1943) 143.
3. Lindsay, G. A. and Rhines, C. M. *J. Bact.* **24** (1932) 489.
4. Lemoigne, M., de Somer A., and Croson, M. *Compt. rend.* **232** (1951) 1778.
5. Woods, D. D. *Biochem. J.* **32** (1938) 2000.
6. Steinberg, R. A. *J. Agric. Res.* **59** (1939) 731.
7. Lemoigne, M., Monguillon, P., and Desveaux, R. *Bull. soc. chim. biol.* **20** (1938) 441.
8. Taniguchi, S., Mitsui, H., Toyoda, J., Yamada, T., and Egami, F. *J. Biochem. (Japan)* **40** (1953) 175.
9. Taniguchi, S., Mitsui, H., Nakamura, K., and Egami, F. *Ann. Acad. Sci. Fennicae Ser. A II N:o 60* (1955) 200.
10. Suzuki, N. and Suzuki, S. *Reps. Tohoku Univ. 4th Ser. Biol.* **20** (1954) 195. Ref. C. A. **49** (1955) 4077 g.
11. Klausmeier, R. E. and Bard, R. C. *J. Bact.* **68** (1954) 129.
12. Nason, A., Abraham, R. G., and Averbach, B. *Biochim. Biophys. Acta* **15** (1954) 159.
13. Kluyver, A. J. and Donker, H. J. L. *Chem. Zelle & Gewebe* **13** (1926) 134.
14. Elema, B. Dissertation, Delft (1932).
15. Yamada, T. and Virtanen, A. I. *Acta Chem. Scand.* **10** (1956) 20.
16. Allen, M. B. and van Niel, C. B. *J. Bact.* **64** (1952) 397.
17. Kluyver, A. J. *6th Intern. Congr. Microbiol. Symposium* (1953) 71.
18. Nicholas, D. J. D., Nason, A., and McElroy, W. D. *Nature* **172** (1953) 34.
19. Colter, J. S. and Quastel, J. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **27** (1950) 368.
20. Silver, W. S. and McElroy, W. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **51** (1954) 379.

21. van Niel, C. B., Allen, M. B., and Wright, B. E. *Biochim. Biophys. Acta* **12** (1953) 67.
22. Evans, H. J. and Nason, A. *Plant Physiol.* **28** (1953) 233.
23. Vishniac, W. and Ochoa, S. *J. Biol. Chem.* **195** (1952) 75.
24. Kessler, E. *Planta* **45** (1955) 94.
25. Stoy, V. *Physiol. Plant.* **8** (1955) 963.
26. Virtanen, A. I. and Laine, T. *Suomen Kemistilehti B* **9** (1936) 24.
27. Endres, G. and Kaufmann, L. *Ann.* **535** (1938) 1.
28. Maurer, K. *Biochem. Z.* **189** (1927) 216.
29. Lüers, H. and Mengele, J. *Biochem. Z.* **179** (1926) 238.
30. Virtanen, A. I. and Saris, N.-E. *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 337.
31. Saris, N.-E. *Finska Kemistsamf. Medd.* **64** (1955) 65.
32. Alfthan, M. and Virtanen, A. I. *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 186.
33. Virtanen, A. I. and Saris, N.-E. *Acta Chem. Scand.* **10** (1956) 483.
34. Lipmann, F. and Tuttle, C. *J. Biol. Chem.* **159** (1945) 21.
35. Chou, T. C. and Lipmann, F. *J. Biol. Chem.* **196** (1952) 89.
36. Virtanen, A. I. and Arhimo, A. A. *Suomen Kemistilehti B* **12** (1939) 24.
37. Yamashina, I., Shikata, S., and Egami, S. *Bull. Chem. Soc. Japan* **27** (1954) 42. Ref. C. A. **49** (1955) 14831f.

Om riboflavinproduktion hos mikroorganismer

(On the Production of Riboflavin by Micro Organisms)

Tor-Magnus Enari

Helsingfors Universitet, Biokemiska laboratoriet

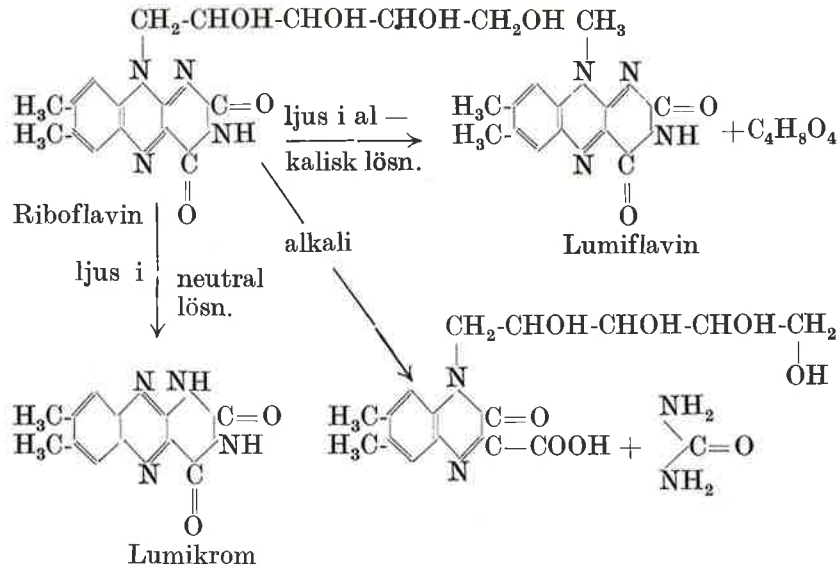
Vid sina grundläggande undersökningar av cellandningen hos jäst isolerade Warburg och Christian¹ 1932 ett gult enzym som de kallade »Gelbferment». De fann att detta enzym bestod av ett protein och en prostetisk grupp som hade en karakteristisk gul färg. Samtidigt framställde Banga och Szent-Györgyi² ur hjärtmuskul ett koenzym som deltog i cellandningen hos djurvävnader. Detta koenzym, som hade en intensiv gul färg, kallade de cytoflav och de kunde också visa att färgämnet var reversibelt oxiderbart.

En tredje forskargrupp under ledning av Kuhn³ var sysselsatt med B-vitaminundersökningar och vid anrikning av B₂-vitamin observerade man att lösningens färg blev allt gulare. 1933 framställdes först ett kristallint preparat ur ägg och något senare ur mjölk. Dessa kallades ovoflavin och laktoflavin. Vid sina undersökningar av ovoflavin fann Kuhn⁴ med medarbetare att vid belysning i svagt alkalisk lösning denna substans sönderföll på samma sätt som Warburgs gula enzym under bildning av lumiflavin. Då det även påvisats att Warburgs gula enzym har en tillväxtbefordrande effekt på råttor hade för första gången sambandet mellan ett vitamin och ett enzym påvisats.

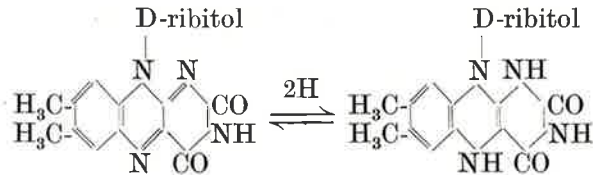
Riboflavinet, som är ganska stabilt i sura lösningar, sönderfaller lätt i alkaliska och neutrala lösningar speciellt under inverkan av ljus:

Dessa sönderfallsreaktioner har varit av stor betydelse vid klarläggandet av riboflavinets struktur. Denna bevisades slutligen genom syntes av Karrer med medarbetare⁵.

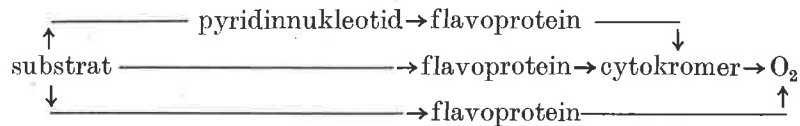
Riboflavinet är, som redan Warburg och Christian¹ samt Banga och Szent-Györgyi² konstaterade, verksamt såsom koenzym vid cellandningen. Den egenskap som här kommer att vara av avgörande betydelse är riboflavinets reverseibla reduktion. Om man till en riboflavinlösning tillsätter något reduktions-



medel, t.ex. ditionit, reduceras riboflavinet, men det oxideras lätt igen redan vid omskakning med luft. Därvid reduceras luftens syre till väteperoxid.



Vid cellandningen oxideras substratet och även därvid är syren slutliga väteacceptorn. Vätet eller elektronerna transporteras från substratet över en rad olika enzymer till syret:



Flavoproteinerna är ett mellanled i ett flertal oxidationssystem. I dessa flavoproteinenzym utgörs den prostetiska gruppen antingen av riboflavinfosfat (flavinmononukleotid) (FMN) eller flavinadeninindinukleotid (FAD) där riboflavinfosfatet är bundet medels en pyrofosfatbindning vid nukleotiden adenylsyra.

Tabell 1.
Metaller i flavoproteinenzym⁶.

metall	enzym
koppar	butyryl-Co A-dehydrogenas
järn	DPNH-cytokrom-reduktas
	DPNH-oxidas
	fumarsyra-hydrogenas
	bärnstensyra-dehydrogenas
	xantin-oxidas
	hydrogenas
	acyl-Co A-dehydrogenas
	TPNH-cytokrom-reduktas
järn-porfyrin	aldehyd-oxidas
molybden	xantin-oxidas
	aldehyd-oxidas
	nitrat-reduktas
	hydrogenas
mangan	hydrogenas
okänd	nitrit-reduktas
	hydroxylamin-reduktas

De undersökningar som företagits av Mahler med medarbetare⁶ under de senaste åren har visat att ett flertal av flavoproteinenzymerna även innehåller en eller två metaller som är nödvändiga för deras funktion (Tabell 1). Det är dock skäl att observera att icke alla flavoproteinenzym innehåller någon metall. T.ex. aminosyraoxidaserna, som oxiderar aminosyror under direkt reduktion av luftens syre, är flavoproteiner utan någon metall. Mahler och Elowe⁶ har närmare undersökt cytochrom c-reduktas-enzymet. Detta enzym har FAD som prostetisk grupp och innehåller järn. Dessa forskare har även framlagt en hypotetisk strukturformel för enzymet (Fig. 1). I detta komplex är riboflavin bundet vid enzymproteinets medels en järnatom. Syror spjälkar bindningarna a och b varvid järnet frigörs.

Endast ett fåtal mikroorganismer fordrar riboflavin som tillväxtfaktor. De flesta av dessa mikrober finns bland mjölksyrebakterierna vilka också i övrigt är de, vad tillväxtfaktorer beträffar, mest fordrande bakterier man undersökt. Dessa, t.ex.

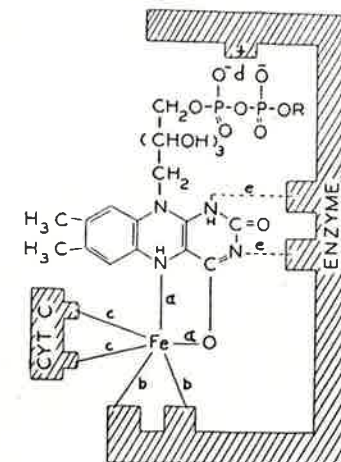


Fig. 1. Hypotetisk strukturformel för cytochrom c-reduktas⁶.

Lactobacillus casei, kan användas till kvantitativa bestämningar av riboflavin. Förmågan att syntetisera riboflavin är däremot allmän bland mikroorganismerna. På grund av riboflavinet universella betydelse, som en beståndsdel av cellens andnings-system, kan man anta att alla mikrober som inte fordrar färdigbildat riboflavin i näringslösningen är i stånd till syntes av detta vitamin. Mikroorganismerna syntetiserar emellertid icke riboflavin bara till eget behov utan många arter utsöndrar även riboflavin i näringslösningen. Några mikroorganismer syntetiserar och utsöndrar t.o.m. mycket stora mängder riboflavin under vissa betingelser. I tabell 2 har de organismer som bildar de största mängderna sammanförst. Den riboflavinnmängd som bildas beror i hög grad på näringslösningens sammansättning och andra försöksförhållanden. De här angivna siffrorna har uppnåtts av olika forskare under varierande förhållanden och måste därför betraktas endast som exempel på hurdana koncentrationer som kan erhållas. Dessa värden är i allmänhet de högsta som angivits i litteraturen.

Tabell 2.

Riboflavinproduktionen hos några mikroorganismer

Mikroorganism	Riboflavin i lösningen mg/l
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	57.5
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	97.0
<i>Candida guilliermondii</i>	175
<i>Candida flareri</i>	567
<i>Ashbya gossypii</i>	1760
<i>Eremothecium ashbyii</i>	2480

Clostridium acetobutylicum är den första organismen som tagits i bruk för industriell produktion av riboflavin. Detta skedde år 1937. Denna anaeroba bakterie användes för framställning av aceton och butanol. Efter jäsnings avdestilleras lösningsmedlen och riboflavinet utvinns ur den torra extraktionsresten. Som huduvsakligt näringsämne har man vid *Clostridium*-jäsningsarna använt såväl sockermelass och majs mjöl som skummjolk. Den största svårigheten vid användning av *Clostridium acetobutylicum* för riboflavinproduktion utgörs av näringslösningens järnhalt. Järnet förhindrar nämligen riboflavinproduktionen redan i relativt små koncentrationer. Detta medför flere tekniska svårigheter. Man måste avlägsna järnet från näringslösningen och endast glas- eller aluminiumtankar kan användas för jäsningsen. För att avlägsna järnet har man dels använt jonbytare dels tillsatt *a,a'*-dipyridyl som bildar ett komplex med järnet. Man kan dock icke använda den senare metoden för att binda järnet i sockermelass, som utgör det kanske billigaste utgångsmaterialet. *Clostridium acetobutylicum* har emellertid även en

stor fördel, nämligen att denna bakterie även producerar aceton och butanol som är värdefulla lösningsmedel och sålunda höjer processens lönsamhet.

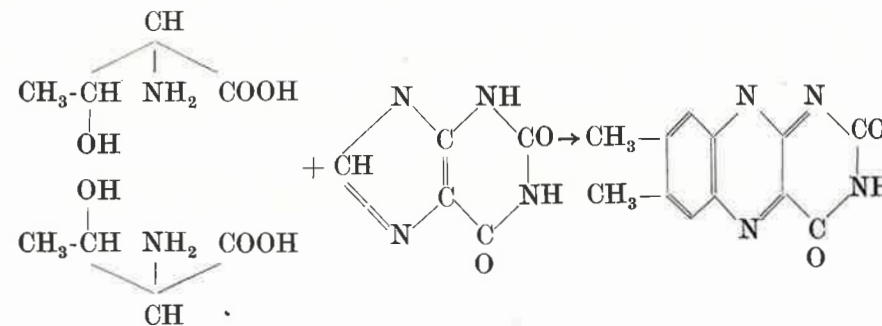
Candida-jästarterna producerar större mängder riboflavin men de är ännu känsligare för järn än *Clostridium acetobutylicum*. Inga uppgifter finns tillgängliga rörande en eventuell användning av *Candida*-jästartar vid industriell riboflavinframställning.

De bästa riboflavinproducenterna är *Ashbya gossypii* och *Eremothecium ashbyii* av vilka den senare bildar så mycket riboflavin att det kristalliseras i cellvakuolerna. Båda dessa mikrober används vid teknisk riboflavinproduktion i U.S.A. De har även den stora fördelen att de icke är känsliga för järn i sådana koncentrationer som här kan komma i fråga.

Alla dessa mikroorganismer är i stånd till totalsyntes av riboflavin. Som kvävekälla duger ammoniumsalter och någon sockerart är nödvändig för tillfredställande av mikrobens energibehov. Men trots att riboflavin kan uppbyggas ur dessa enkla föreningar kan naturligtvis vissa föreningar vara bättre utgångsmaterial för riboflavinsyntesen än andra. Redan 1944 undersökte Burkholder⁷ inverkan av olika aminosyror på riboflavinproduktionen hos *Candida guilliermondii*. Han fann därvid att den var störst när jästen utom ammoniak även fick asparagin och metionin. Huruvida dessa aminosyror inverkar på jästens tillväxt eller om de har en specifik inverkan på riboflavinsyntesen framgår icke av försöken.

Undersökningarna av riboflavinet biosyntes påbörjades av MacLaren⁸ som 1953 undersökte inverkan av olika pyrimidin- och purinbaser på riboflavinproduktionen hos *Eremothecium ashbyii*. Han fann att xantin, adenin, guanin och urinsyra befördrar riboflavinsyntesen medan uracil förhindrar den. Härav kan man sluta sig till att purinbaserna är mellanled i riboflavinsyntesen.

Vid en undersökning av riboflavinet biosyntes hos *Eremothecium ashbyii* fann Goodwin och Pendlington⁹ i England att även aminosyrorna treonin och serin ökar riboflavinproduktionen och att dessas och xantinetts effekt är additiv. På grund av sina försök antog de att treonin och xantin utgör prekursorer till olika delar av riboflavinmolekylen och har framlagt följande hypotetiska schema för riboflavinet biosyntes:



Plaut¹⁰ har undersökt upptagningen av radioaktivt C¹⁴ ur olika föreningar i riboflavin och erhållit resultat som väl stämmer överens med antagandet att purinbaserna utgör ett mellanled vid riboflavinsyntesen (Fig. 2).

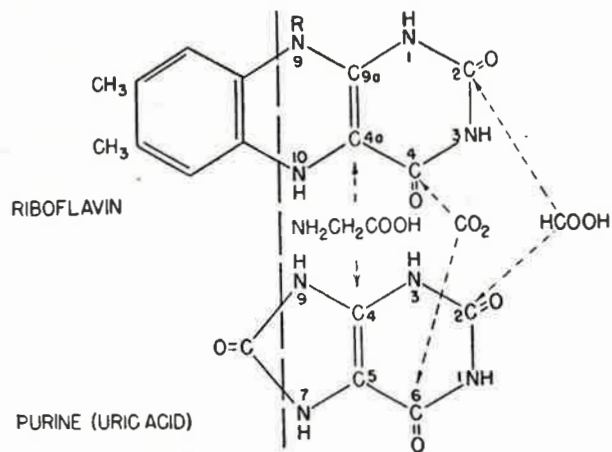


Fig. 2. C¹⁴-inkorporering i riboflavin och purin¹⁰.

En faktor av avgörande betydelse för riboflavinproduktionen är, som redan nämnts, näringslösningens järnhalt. Arzberger¹¹ undersökte 1943 inverkan av järn, kobolt, koppar, zink och bly på riboflavinproduktionen hos *Clostridium acetobutylicum*. Han fann därvid att järn och kobolt i en koncentration av 3.2 mg/l starkt minskade denna medan de övriga jonerna icke hade samma effekt. Järnets inverkan på riboflavinproduktionen hos jästarten *Candida guilliermondii* undersöktes två år senare av Tanner med medarbetare¹². De fann att denna jästart är mycket känsligare för järnets inverkan. Redan 0.1 mg/l järn i näringslösningen hämmar starkt riboflavinproduktionen. Helt utan järn förlöper naturligtvis icke heller riboflavinsyntesen normalt. En total järnbrist hämmar starkt mikroorganismens tillväxt och sålunda blir även riboflavinproduktionen mindre. Den, för riboflavinproduktionen, optimala järnkoncentrationen är för *Clostridium acetobutylicum* 1—3 mg/l och för *Candida guilliermondii* 5—10 µg/l. Dessa järnkoncentrationer är så små att vid teknisk riboflavinproduktion näringslösningens järnkoncentration lätt blir en begränsande faktor. Det är naturligtvis svårt att avlägsna järnet ur sockermelass, majsmjöl och andra dylika tekniska kolhydrater.

Vid universitetets biokemiska laboratorium har inverkan av kobolt på riboflavinproduktionen hos *Candida guilliermondii*

undersökts¹³. Vid ett försök odlades jästen i näringslösningar innehållande olika mängder kobolt. Prov togs efter 1, 5, 24 och 30 timmar för riboflavinbestämning. Efter 1 och 5 timmar kunde ännu inget riboflavin upptäckas i näringslösningen. De riboflavinmängder som bildats på 24 och 30 timmar framgår ur fig. 3. Riboflavinproduktionen uppvisar ett tydligt maximum för 10⁻⁴-m kobolt.

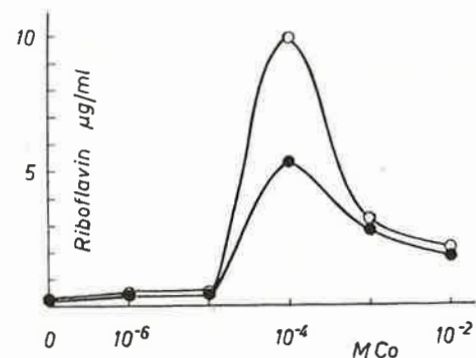


Fig. 3. Inverkan av kobolt på riboflavinproduktionen hos *Candida guilliermondii* i näringslösning innehållande 5 × 10⁻⁷-m Fe.

Även några andra katjoner och molybdatjonens inverkan på riboflavinproduktionen i en koncentration av 10⁻⁴-m undersöktes (Tabell 3). Utom kobolt är det endast zink som har en i någon mån ökande effekt på riboflavinproduktionen men alla de övriga jonerna förhindrar denna.

Tabell 3.

Inverkan av några joner på riboflavinproduktionen hos *Candida guilliermondii* i en koncentration av 10⁻⁴-m. Riboflavinet bestämt efter 20 timmars odling.

Tillsatt jon	Riboflavin i lösningar mg/l
Ingen	2.6
Co ⁺⁺	13.6
Mn ⁺⁺	0.3
Zn ⁺⁺	4.7
Cu ⁺⁺	0.0
MoO ₄ ⁻	0.0

Försök som utfördes i olika kobolt- och järnkoncentrationer visade att en ökning av näringslösningens koboltkoncentration ökar den för riboflavinproduktionen optimala järnkoncentrationen och en ökning av järnkoncentrationen ökar den optimala koboltkoncentrationen. Detta visar att en intim relation existerar mellan järnets och koboltens inverkan på riboflavinproduk-

tionen. Då det redan tidigare är känt att järn förhindrar riboflavinproduktionen förefaller det sannolikt att koboltens inverkan kan förklaras så att den kompetitivt förhindrar järnets hämmande inverkan och sålunda indirekt ökar riboflavinproduktionen. En undersökning av jästens järn- och koboltupptagning, som företogs med tillhjälp av radioisotoperna Fe^{59} och Co^{60} , stöder även detta antagande.

Tillägg. Efter det denna artikel redan satts har Goodwin och Pendlington *Biochem. J.* **64** (1956) 9) publicerat en undersökning av inkorporeringen av C^{14} -serin i riboflavin. Av deras försök framgår att hypotesen på sid. 51 är oriktig. Serin inbyggs icke i den aromatiska ringen men väl i riboflavinet "purindel".

Summary

This paper is a lecture delivered on the 26th of April 1956 before the meeting of Finska Kemistsamfundet. It gives a review of the production of riboflavin by microorganisms and the biosynthesis of riboflavin. The authors own investigations on the effect of cobalt and iron on riboflavin production by *Candida guilliermondii* are shortly described.

Litteratur

1. Warburg, O. och Christian, W. *Biochem. Z.* **254** (1932) 438.
2. Banga, J. och Szent-Györgyi, A. *Biochem. Z.* **246** (1932) 203.
3. Kuhn, R., Györgyi, P. och Wagner-Jauregg, T. *Ber.* **66** (1933) 317, 576, 1034.
4. Kuhn, R. och Rudy, H. *Ber.* **68** (1935) 383.
5. Karrer, P., Schöpp, K., Salomon, H., Schlitter, E. och Fritzsche, H. *Helv. Chim. Acta* **17** (1934) 1010.
6. Mahler, H. R. och Elowe, D. G. *J. Biol. Chem.* **210** (1954) 165.
Mahler, H. R., Mackler, B., Green, D. E. och Bock, R. B. *J. Biol. Chem.* **210** (1954) 465.
Mahler, H. R. och Glenn, J. L. *Inorganic Nitrogen Metabolism*, 1956, s. 575.
7. Burkholder, P. R. *Arch. Biochem.* **3** (1944) 121.
8. MacLaren, J. A. *J. Bacteriol.* **63** (1952) 233.
9. Goodwin, T. W. och Pendlington, S. *Biochem. J.* **57** (1954) 631.
10. Plaut, G. W. E. *J. Biol. Chem.* **208** (1954) 513.
Plaut, G. W. E. *J. Biol. Chem.* **211** (1954) 111.
Plaut, G. W. E. och Broberg, P. L. *J. Biol. Chem.* **219** (1956) 131.
11. Arzberger, C. F. *U.S. Patent* 2 326 425 (1943); Ref. i *Vitamins and Hormones* **6** (1948) 161.
12. Tanner, F. W., Jr., Vojnovich, C. och Van Lanen, J. M. *Science* **101** (1945) 180.
13. Enari, T.-M. *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 1726.
Enari, T.-M. *Licentiatavhandling*, Helsingfors 1956.

Om utbytet mellan faserna i systemet Cu-metall/Ag-lösning

(On the Exchange between Phases in the Arrangement Cu-Metal/Ag-Solution)

T. E. Brehmer

Tekniska Högskolan.

Tillägnad prof. Yrjö Kauko.

Vi ha tidigare (1) redogjort för utfällningen av silver på kopparanoder vid elektrolys. Vid ökad anodisk strömthet minskades utbytesströmmen: $1Cu^+ + 2Ag^+ \rightarrow 1Ag^+ + 2Cu^+$. Vi ha teoretiskt (2) uppskattat en undre gräns för utbytesströmtheten i ett system $1Ag^+ / 2AgNO_3$ där den fasta fasen inte haft någon pålagd potential. Vi erhöll ett undre gränsvärde, som var cirka tredjedelt till trettonde-delen av de värden Gerischer (3) fått vid sina mätningar av utbytesströmmen i liknande fall. Vid våra elektrolysförsök (1) var utbytesströmmen av samma storleksordning som den Gerischer erhållit, ehuru elektrolyserna skedde i andra system. Utbytesströmmen anses vid låga koncentrationer bero huvudsakligast av diffusionen i lösningen och av anionen (4, 4a, 4b), antaga vi dessutom att omkristallisationer icke störa utbytesförloppet, borde i lika lösningar, men vid olika fast metallisk fas utbytesströmmarna vara lika; man kunde alltså vänta sig att i systemen $1Cu^+ / 2Ag^+$ och $1Ag^+ / 2Ag^+$ utbyteshastigheterna vore lika.* Vi ha undersökt systemet $1Cu^+ / 2Ag^+$ i några fall för att kunna jämföra dessa med det mera kända systemet $1Ag^+ / 2Ag^+$.

Vi använde följande av oss tidigare utarbetade metod. Några lösningar med bestämd Ag-halt tillreddes. Av elektrolytkoppar framställda värmebehandlade trådelektroder avfettades elektrolytiskt, betades i 10 %-ig salpetersyra och sköljdes därefter väl. Därpå neddoppades de i en av lösningarna. På grund av silverutfällningen svärtades de. På förhand hade en viss normalsvärtning fastslagits. Trådarna, som varit i lösningen hade olika svärtning allt efter den tid de varit neddoppade. Genom jämförelse mellan svärtningsnormalen och trådelektroder utvaldes den tråd som var lika svärtad. Tiden t_s , som denna tråd varit i lösningen, annoterades. Flere försök gjordes med varje lösning. Det visade sig att man på detta sätt erhölet ett gott statistiskt material för svärtningstiden t_s i var och en av de olika lösning-

* Det är självfallet att inhibition kan förändra förloppet, men vi ha förutsatt att en sådan i stort sett förlöper lika för Cu och Ag.

garna skilt för sig. Försöken skedde under omröring och volymen var så stor att lösningskoncentrationen kunde anses konstant under neddoppningstiden. Följande resultat erhöles med ett chelat system:

Tabell I. Svärtningstid i min för Cu neddoppad i silver-8-hydroxy, 5 sulfonsyra-kinolin-lösning med molförhållandet 2:1 = Ag: chelat. Rumstemperatur, försöken utförda av tekn.stud. R. v. Schalien.

t_s min.	Ag mol/l
0,33	0,0060
2,75	0,0040
4,00	0,0030
6,00	0,0020
8,60	0,0012

En lika svärtning av alla trådarna betyder att lika mycket silver utfallit per ytenhet. Vi beteckna med Q_s det mot tiden t_s svarande silverskiktets uttryckt i coulomb/cm². Utbytesström-tätheten blir då:

$$1) I = \frac{Q_s}{t_s} \text{ coulomb} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$$

eller om vi uttrycka I i amp/cm²

$$I = \frac{Q_s}{t_s}$$

Antaga vi att skeendet kan förliknas med en första ordningens reaktion, vilket betyder att blott silverkoncentrationen är av-görande för svärtningstiden (Cu konc. = 0 i lösningen under den korta neddoppningstiden) borde alltså t_s kunna uttryckas loga-ritmiskt i koncentrationen. Vi sätta alltså:

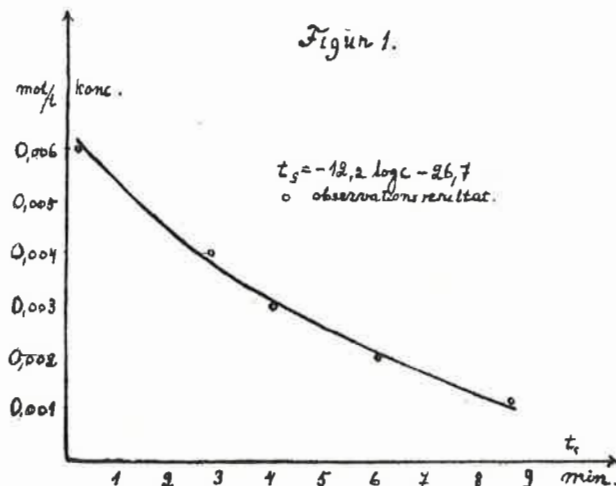
$$2) t_s = k' \ln c + k'' \text{ eller } t_s = K_1 \log c + K_2$$

och bestämma ur försöksvärdena i Tabell I K_1 och K_2 . Vi finna

$$K_1 = -12,19 \text{ och } K_2 = -26,70 \text{ och skriva}$$

$$3) t_s = -12,2 \log c - 26,7$$

vilket gäller i det ifrågavarande koncentrationsområdet, i de givna lösningarna och vid rumstemperatur. I figur 1 är funk-tionsförloppet av 3) återgivet och de experimentella värdena ur tabell I inprickade. För att utbytesström-tätheten skall kunna bestämmas måste Q_s vara känd. Då små mängder silver på koppar erbjuder besvärligheter att analytiskt bestämma ha vi förfarit på följande sätt: En stor kopparelektrod lika behandlad som de andra elektroderna med ytan $K = 26,1 \text{ cm}^2$ neddoppa-



des under omröring i en jämförelsevis liten volym ($V = 0,06 \text{ l}$) av chelatlösningen med Ag-koncentrationen $0,003 \text{ mol/l}$. Efter 30 sek. togs elektroden bort varefter svärtningstiden bestämdes ånyo för lösningen. t_s var nu $5,2 \text{ min}$.* Ur figur 1 finna vi att denna svärtningstid svarar mot koncentrationen $0,0023 \text{ mol/l}$. Under 30 sek. utföll inalles på en yta av $26,1 \text{ cm}^2$:

$$(0,003 - 0,0023) \cdot 0,06 \text{ mol silver dvs.}$$

$$I = \frac{0,0007 \cdot 0,06 \cdot 96\,500}{30 \cdot 26,1} \frac{\text{coul} \cdot \text{mol}}{\text{mol}} \cdot \frac{1}{\text{sec} \cdot \text{cm}^2}$$

och således

$$I = 5,17 \cdot 10^{-3} \text{ amp/cm}^2$$

Denna medelutbytesström-täthet för lösningarna med koncen-trationerna mellan $0,003$ och $0,0023 \text{ mol/l}$ tillskriva vi koncen-trationen $0,0027 \text{ mol/l}$. Ur kurvan 1 erhålles det korresponde-rande värdet $t_s = 4,5 \text{ min}$. Eftersom $I \cdot t_s \cdot 60 = Q_s$ erhålla vi

$$4) Q_s = 5,17 \cdot 4,5 \cdot 60 \cdot 10^{-3} \text{ coul/cm}^2 \rightarrow 1,4 \text{ coul/cm}^2$$

Räkna vi därur den utfällda silvermängden i vår svärtning finna vi den $1,57 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^2$. Då Q_s är bestämd kan alltså utbytes-ström-tätheten i alla fallen beräknas ur relation 1). Vi få resul-taten i tabell II.

* Detta förfarande har föreslagits av Stud. R.v. Schalien.

I amp/cm ²	Ag mol/l
71 · 10 ⁻³	0,006
8,5 · 10 ⁻³	0,004
5,8 · 10 ⁻³	0,003
3,9 · 10 ⁻³	0,002
2,7 · 10 ⁻³	0,0012

Enligt författaren (5) varierar utbytesströmmen med tiden. De erhållna värdena äro beroende av Q_s och äro alltså medelvärden. Ett annat Q_s val hade givit något andra värden. Svärtningstiden uppmättes också i silvernitratlösningar. För en 0,003 molar silvernitratlösning erhöles svärtningstiden 1,1 min. Härur beräknas I till $21 \cdot 10^{-3}$ amp/cm². Utbytesström-tätheten är blott cirka 3,6-faldig mot den i chelatlösningen av samma konc. Det kan anses sannolikt att utom Ag-jonen, hydratiserad eller icke, ävenså Ag i chelatet byter direkt med den fasta fasens joner. Vid en teoretisk granskning av utbytesmekanismen bör alltså chelatets »ytbehov» på den fasta fasen tagas med i beräkningen.

Summary

This paper is a continuation for an earlier investigation published in this journal.

Litteratur

- 1) Finska Kemistsamf. Medd. 62 1953.
- 2) Finska Kemistsamf. Medd. 63 1954.
- 3) Gerischer-Vielstich, Z. El. chem. 56 480 1952.
- 3) Gerischer-Tischer, Z. El. chem. 58 819 1954.
- 4) Haissinsky, Cottin, Varabeijan, J. chim. Phys. 45 212 1948.
- 4a) Haissinsky, Cottin, J. chim. Phys. 46 476 1949.
- 4b) Haissinsky, Pappas, J. chim. Phys. 47 506 1950.
- 5) Tekn. fören. i Finland Förh. 75 1955.

On Hydrolysis Equilibrium

B. V. E n ü s t ü n

Department of Physical Chemistry, University of Ankara

Dedicated to Prof. Yrjö Kauko

It is a usual practice in all text books of physical chemistry to derive expressions for hydrolysis constants of salts, which read

$$K_h = K_w/K_a \quad \dots \quad (1),$$

$$K_h = K_w/K_b \quad \dots \quad (2)$$

$$\text{and } K_h = K_w/K_a K_b \quad \dots \quad (3)$$

in the cases of salts of a strong base and weak acid, weak base and strong acid, and weak base and weak acid; where K_a , K_b and K_w are the dissociation constants of weak acid, weak base and water; respectively, treating each case separately without any reference to the relation between them.

We have observed that this practice could be misleading in undergraduate courses. The student presumes that the first and second are the special cases of the third case and, therefore, the equations (1) and (2) should be derivable directly from (3). However, his attempt in this direction results in a paradox. Namely, substituting $K_b \approx \infty$ and $K_a \approx \infty$ in equation (3) in the cases of salts of a strong base and weak acid, and a weak base and strong acid, respectively, one gets $K_h \approx 0$. It is the purpose of this paper to draw attention to the necessity of treating the problems of hydrolysis in a more general manner and to eliminate this apparent paradox.

First, let us consider the general neutralization reaction



between a base B^β and an acid HA^α , where the superscripts indicate the ionic charges. B^β and HA^α could be ions such as OH^- and H_3O^+ , as well as neutral molecules such as NH_3 and HA_c . In the latter cases β and α are zero. It follows that the hydrolysis constant is given by

$$K_h = a_{B^\beta} a_{HA^\alpha} / a_{BH^{\beta+1}} a_{A^{\alpha-1}} \quad (4).$$

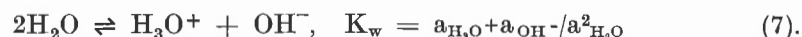
Secondly, let us define the dissociations and dissociation constants of base B^β and acid HA^α by



and

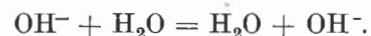


respectively, whatever B^β and HA^α be. On the other hand we have



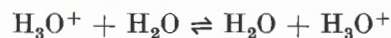
From equations (4), (5), (6) and (7) we obtain equation (3) which now appears to be a general expression to cover all three cases mentioned above.

The application of this expression to the third case offers no difficulty. In the first and second cases, however, one should be careful as to what value one should take for K_b and K_a , respectively. What we assume for a strong base is that it dissociates completely to yield OH^- ions. Therefore, the neutralization reaction we have to consider involves OH^- ions as base B^β . By the above definition the dissociation of OH^- is



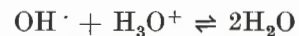
Obviously, the equilibrium constant of this reaction is unity. In other words, $K_b = 1$ in the case of a strong base and a weak acid. By this substitution equation (3) reduces to (1).

Similarly, the neutralization reaction in the case of a weak base and a strong acid involves H_3O^+ ions as acid HA^α . Since the dissociation of H_2O is given by the reaction



by definition, then $K_a = 1$. In this case equation (3) reduces to (2).

Finally, in the case of a strong base and a strong acid $K_b = 1$ and $K_a = 1$. It follows from equation (3) that $K_h = K_w$ which is an obvious result since the neutralization reaction in this case is



and the hydrolysis is nothing but dissociation of water.

Manometric Determination of Carbon Dioxide with Soda-Asbestos

Rolf Uggla

Laboratory of Physical Chemistry, Institute of Technology, Helsinki, Finland

Fig. 1 illustrates the pyrex glass apparatus for the analysis of carbon dioxide. It consists in principle of a gas container (ca 500 cm³) communicating with a Töpler pump filled with Hg, which also acts as manometer. The examined, dried (P₂O₅) gas mixture is led via a (b) and c to b (a), which is linked with a Hg lock. The stopcocks d and e are closed at the time. In between these stopcocks there is an absorption tube with soda-asbestos. The gas volume of the tube is small as compared to that of the

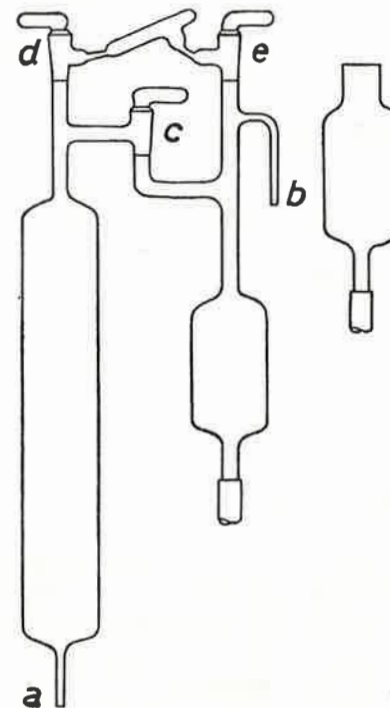


Fig. 1. Apparatus for manometric analysis of carbon dioxide with soda-asbestos

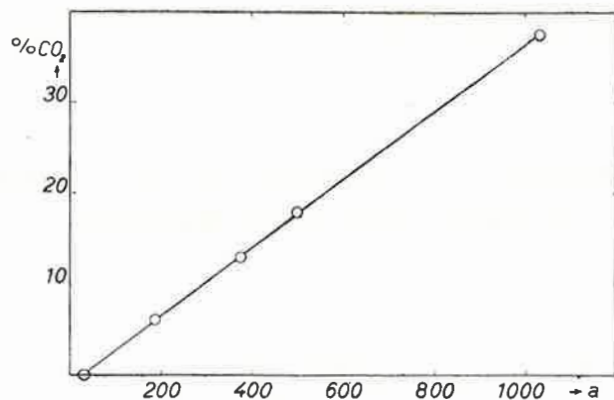


Fig. 2. Interferometric calibration curve for CO₂-N₂ gas mixtures

gas container. When the analysed gas mixture has filled the apparatus, tubes a and b are sealed off by fusing (in order to reduce the number of stopcocks). After this the gas container of the apparatus is immersed into a thermostat and the Hg surface of the Töpler pump is adjusted in a certain position (constant volume). A reading of the barometric and manometric pressure is performed (cathetometrically), stopcock e being opened at the moment the reading is done. Thereafter stopcock d is also opened, while stopcock c is closed and the analysed gas mixture is pumped back and forth through the absorption tube, until a constant manometric pressure, appears. Especially at lesser pCO₂ pressure stopcock c should be opened when taking the reading of the manometric pressure, in order to avoid possible differences in pressure. Variations in barometric pressure are taken into considerations.

With a view to checking up on the method described, a Zeiss interferometer (25 cm cell length) was calibrated for dried CO₂-N₂ gas mixtures. The calibration curve is seen on Fig. 2. During calibration the interferometer's measuring cell and reference cell (filled with N₂ gas) had a fairly similar temperature and gas pressure.

Attempts were also made to make a manometric analysis of carbon dioxide with the aid of liquid oxygen. E.g. for a gas mixture of CO₂-N₂ consideration should be given to adsorption of nitrogen at the walls of the U-shaped condensation tube (of glass), which is immersed (constant depth of immersion) in liquid oxygen. Moreover, adsorption may possibly be affected by solid carbon dioxide.

References

Uggla, R. Manometric Determination of Oxygen by Oxidation of Metallic Copper. To be published.

Kemiska Sällskapets i Åbo verksamhet

Protokoll fört vid Kemiska Sällskapets i Åbo ordinarie möte torsdagen den 14 april kl. 19.30 i Åbo Akademis Auditorium V. Förhandlingarna leddes av Sällskapets ordförande dipl.ing. Henning Doepel. Närvarande 16 medlemmar.

- § 1. Ordföranden hälsade de närvarande välkomna och förklarade mötet öppnat.
- § 2. Protokollet från föregående möte upplästes och förklarades justerat.
- § 3. Ordföranden uppläste en skrivelse från Turun Kemistikerho r.y. i vilken en representant för Sällskapet inbjöds att delta i Klubbens vårfest. På förslag av prof. Ringbom fick styrelsen i uppdrag att utse denna representant.
- § 4. Som nya medlemmar i Sällskapet invaldes på förslag av prof. Ekwall och sekreteraren fil.kandd. *Maj-Lis Filén, Sture Henrikson och Armas Sten* samt på förslag av ordföranden och sekreteraren dipl.ing. *Pentti Jalava*.
- § 5. Tekn.dr *Jacobus Sundman* (Helsingfors) höll ett föredrag om »Framställning av insulin».
- § 6. Mötet avslutades med en filmföreläsning.

Lars Sjöblom

Protokoll fört vid Kemiska Sällskapets i Åbo möte måndagen den 3 oktober 1955 kl. 19.30 i Åbo Akademis Auditorium V. Förhandlingarna leddes av Sällskapets ordförande dipl.ing. Henning Doepel. Närvarande: 10 av Sällskapets medlemmar samt två medlemmar av Turun Kemistikerho och Kemistklubben vid Åbo Akademi.

- § 1. Ordföranden förklarade mötet öppnat och hälsade kvällens gäst professor *Bernd Eistert* från Ludwighshafen och Darmstadt välkommen.
- § 2. Professor Eistert höll ett föredrag betitlat: »Versuche mit Enolen und Endiolen.»

Lars Sjöblom

Protokoll fört vid Kemiska Sällskapets i Åbo möte onsdagen den 2 november 1955 kl. 19.30 i Studentkårens Argentinasal. Förhandlingarna leddes av Sällskapets ordförande dipl.ing. Henning Doepel. Närvarande: 19 medlemmar samt några studerande vid Åbo Akademi.

- § 1. Protokollen från Sällskapets möten den 14/4 och 3/10 upplästes och förklarades justerade.
 - § 2. Som nya medlemmar i Sällskapet invaldes dipl.ing. *Eino Lehtonen* och fil.mag. *Tor Schultz*, föreslagna av ordföranden och sekreteraren.
 - § 3. Sekreteraren uppläste ett brev från Finska Kemistsamfundet, i vilket Sällskapet inbjöds sända en föredragshållare till Samfundets årsmöte den 2 december. På ordförandens förslag erhöles styrelsen i uppdrag att utse föredragshållaren.
 - § 4. Ordföranden meddelade att programmet för nästa möte skulle uppta ett antal föredrag om atomkraften.
 - § 5. Professor *Adolf Metzger* höll ett föredrag om »Vattnet i naturen», dipl.ing. *Eino Lehtonen* redogjorde för »Råvattensituationen i Åbo» och fil.mag. *Erkki Linko* talade om »Rening av konsumtionsvatten».
- I anslutning till föredragen yttrade sig förutom ordföranden och föredragshållarna, medlemmarna *Forss, Qvist, Nylander, Bergfors* och *Juup*.
- Ing. Lehtons föredrag har utförligt refererats i Hufvudstadsbladet den 5/11/55.

Lars Sjöblom

Notiser — Uutisia

V Kemistipäivät 18—19. 1. 1957

Suomen Kemistien Valtuuskunnan järjestämien perinteellisten Kemistipäivien kokouspaikkana on Tieteellisten Seurain talo (ent. Säätytalo) Snellmanink. 9—11.

Alustava ohjelma

Perjantaina 18. 1. 57

- klo 10.00 *Prof. A. I. Virtanen*: Avaussanat
Prof. K. Ziegler: Neuere Entwicklungen der Metallorganischen Synthesen
Keskustelua esitelmän johdosta
12.00 Lounastauko
14.00 KELAATTISYMPOSIUM *
Prof. R. Näsänen: Metallikelaattien stabiilisuudesta vesiliuoksissa.
Tekn. lis. T. Nortia: Kelaattien magneettisista ominaisuuksista.
Prof. A. Ringbom: Om chelatkomplexernas användning vid kemisk analys.
Fil.maist. J. Kinnunen: Kelaattien käyttö analyttisissä naamioimis- ja ekstrahoisimenetelmissä.
Tekn. tri J. Sundman: Om chelaternas användning i medicinen.
Keskustelua esitelmien johdosta

Lauantaina 19. 1. 56

- klo 9.00 *Prof. G. Sillén*: Högtemperaturkemi
Dipl.ins. A. Merenmies: Otanmäen vanadiinitehdas
Keskustelua esitelmien johdosta
11.00 Lounastauko
13.00 Kemistien tiedonantoja tieteellisistä ja teknillisistä tutkimuksistaan.
Keskustelua tiedonantojen johdosta.
Lopettajaissanat
20.30 Illalliset Insinööritalossa Ratakatu 9.

Ilmoittautuminen

Kemistejä pyydetään ilmoittamaan mieluummin ennen 15.1.1957 osanotetaan Kemistipäiville ja illallisille maksamalla postisiirtotilille N:o 10 225 osallistumismaksuna Kemistipäiville mk 400: — ja illallismaksuna mk 1000: — (juomat eivät sisälly summaan). Illallisille osallistuvia pyydetään noutamaan illalliskorttinsa kokouspaikalta, Tieteellisten Seurain talolta kokouspäivien aikana.

Kemistipäivien sihteerinä toimii fil.lis. Ermo Kaila, os. Helsinki, Arkadiank. 4 F 15, puh. toimeen 440 101, kotiin 55 998.

*

Limfabrikernas Försäljnings AB har utgivit en 24-sidig broschyr med titeln »Information om en kemisk industri». Förutom en presentation av koncernens olika företag — Stockholms Benmjölsfabriks AB, Sandviks Limfabriker, Nykvarns extraktionsverk, Stidsvigs Limfabriker, Bäckebo Industri AB samt Limfabrikernas Försäljnings AB — ges en kort historik av limtillverkningen samt en redogörelse för limindustrin och dess roll inom den svenska exporten. Olika produkter presenteras även, såsom ben- och hudlim, konsthartslim, fodermedel, benfett och animaliska oljor för den kemiska industrin samt en skumsläckningsvätska. Broschyren är rikt illustrerad, såväl med fotografier som teckningar, och är utförd på ett mycket tilltalande sätt.

En specialbroschyr om flockingslim har även utkommit, vari redogöres för lämpliga flockningsmedel vid flockning inom pappersindustrin, vid anrikningsverken samt vid reningsverk för dricksvatten och industrivatten.

* Kelaatti on orgaanisen yhdisteen (esim. kompleksoinin) ja metalli-ionin muodostama rengasyhdiste.

FUELSLIP

— Brännoljetillsatsmedel

FÖR EKONOMISK OLJEELDNING

Befordrar:

Fullständig förbränning genom katalytisk inverkan och reduktion av oljans ytspänning.

Motarbetar:

Svavelskador

Slambildning

Korrosion

Igensättning av munstycken

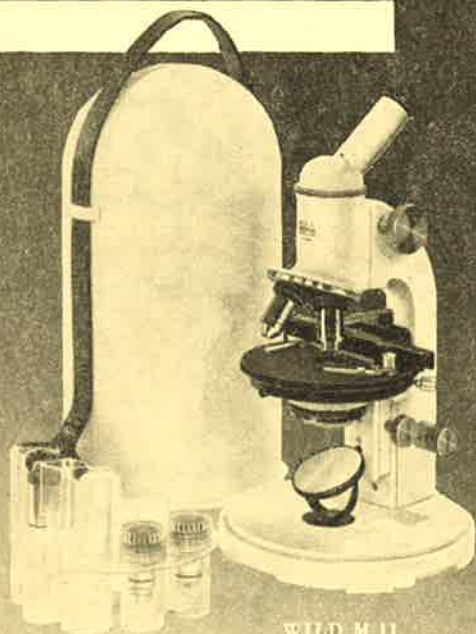
Onödig oljeförbrukning

Leverans från lager



BANG & CO AKTIEBOLAG

WILD
HEERBRUGG



WILD M 11

WILD

-mikroskopet i särklass, schweiziskt
precisionsarbete.

WILD M 11

ett lätt och behändigt mikroskop
för laboratoriet till mycket förmån-
ligt pris.

WILD M 20

det nya forskningsmikroskopet med
alla moderna chikaner.

Alla WILD-stativ

kunna universellt utbyggas med
utrustning för

- faskontrast
- mikrofotografi
- mikrokinematografi
- fluorescens
- polarisation etc.



WILD M 20

A. ILMONEN Ab

Representant i Finland:

Mariegatan 12 - Helsingfors - Tel. 14 577