

Über Alkoholgärung.

I. Mitteilung.

Über die Bildung von Acetaldehyd bei der alkoholischen Zuckergärung.

Von

S. Kostytschew.

(Botanisches Laboratorium des Technologischen Instituts in St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. April 1912.)

Der Mechanismus der alkoholischen Gärung ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Nur in betreff der ersten Phase der Gärung haben Harden und Young¹⁾ und A. v. Lebedew²⁾ dargetan, daß zunächst eine esterartige Verbindung der Monosen mit zwei Molekülen Phosphorsäure von der Zusammensetzung $C_6H_{10}O_4(H_2PO_4)_2$ entsteht. Hierdurch ist nunmehr der Umstand aufgeklärt worden, daß sämtliche vergärbaren Hexosen glatt in Äthylalkohol und Kohlendioxyd zerfallen. Es ergab sich nämlich, daß Glukose, Fruktose und Mannose eine und dieselbe Hexosephosphorsäure bilden; letztere liefert bei der Hydrolyse immer nur Fruktose und Phosphorsäure.

Die genannte Esterbildung bietet jedoch selbstverständlich keine Anhaltspunkte für die Beurteilung des Mechanismus der Zuckerspaltung, da der Ester die noch nicht zersetzte Hexose enthält.

¹⁾ Harden and Young. *Proceed. of the Royal Soc.*, Bd. 77, S. 405 (1906); Bd. 78, S. 369 (1906); Bd. 80, S. 299 (1908); *Zentralblatt für Bakteriol. Abt. II.* Bd. 26, S. 178 (1910); Young, *Proceed. of the Chem. Soc.*, Bd. 23, S. 65 (1907); *Proceed. of the Royal Soc.*, Bd. 81, S. 528 (1909); *Biochemische Zeitschrift*, Bd. 32, S. 177 (1911).

²⁾ A. v. Lebedew, *Biochemische Zeitschrift*, Bd. 20, S. 114 (1909); Bd. 28, S. 213 (1910); Bd. 36, S. 248 (1911). Vgl. auch Euler und Fodor, *Biochem. Zeitschrift*, Bd. 36, S. 401 (1911).

Weiterhin wurde von Boysen-Jensen¹⁾ und von Buchner und Meisenheimer²⁾ die Ansicht entwickelt, daß Dioxyaceton ein intermediäres Gärungsprodukt vorstellt. Die letztgenannten Forscher haben gefunden, daß Dioxyaceton ziemlich gut vergärbar ist. Nun ist aber Dioxyaceton noch immer ein typisches Kohlenhydrat und enthält keine Methylgruppe; infolgedessen ist die Bildung von Äthylalkohol und Kohlendioxyd aus Dioxyaceton ebenso rätselhaft, wie aus Hexosen. Übrigens kann die Vergärbarkeit des Dioxyacetons auf Grund der Angaben von A. v. Lebedew³⁾ dadurch erklärt werden, daß zunächst durch teilweise Umwandlung von Dioxyaceton in Glycerose und nachfolgende Aldolkondensation Fruktose entsteht. Zugunsten dieser Auffassung spricht der Umstand, daß aus Dioxyaceton ebenfalls die bekannte Hexosephosphorsäure gebildet wird.⁴⁾ Die Untersuchungen von Slator⁵⁾ über die Kinetik der Dioxyacetonvergärung sind ebenfalls schwer in Einklang zu bringen mit der Hypothese der intermediären Bildung von Dioxyaceton bei der alkoholischen Gärung der Zuckerarten.

Vom theoretischen Standpunkte aus sind mehrere verschiedenartige Möglichkeiten der Äthylalkohol- und Kohlendioxydbildung aus Kohlenhydraten denkbar. Eine nähere Besprechung dieser Möglichkeiten halte ich um so mehr für überflüssig, als eine erschöpfende Zusammenstellung verschiedener Theorien der alkoholischen Gärung in der neuerdings veröffentlichten Arbeit von H. Franzen und O. Steppuhn⁶⁾ bereits gegeben ist. Aus dieser Zusammenstellung ist sofort ersichtlich, daß auf rein theoretischem Gebiete keine weiteren Vorschritte möglich sind: da wir bis jetzt keinen von den bei

¹⁾ Boysen-Jensen, Botanische Berichte, Bd. 26 a, S. 666 (1908).

²⁾ Buchner und Meisenheimer, Chemische Berichte, Bd. 43, S. 1773 (1910).

³⁾ A. v. Lebedew, Comptes rendus, Bd. 153, S. 136 (1911).

⁴⁾ A. v. Lebedew, l. c. Der Verfasser selbst setzt jedoch voraus, daß die Hexosephosphorsäure durch Kondensation der Triosephosphorsäure entsteht.

⁵⁾ Slator, Chemische Berichte, Bd. 45, S. 43 (1912).

⁶⁾ H. Franzen und O. Steppuhn, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 129 (1912).

der alkoholischen Gärung auftretenden Stoffen mit Sicherheit als ein intermediäres Produkt der Gärung erkannt haben, so sind wir offenbar nicht imstande, die Wahrscheinlichkeit einer jeden Theorie zu beurteilen. Folgende allgemeine Betrachtungen scheinen indes als Leitfaden für experimentelle Untersuchungen dienen zu können.

Da Oxydationsvorgänge bei der alkoholischen Gärung nur im Sinne einer intramolekularen Sauerstoffanhäufung zustande kommen können, so liegt die Annahme nahe, daß Kohlendioxyd von einer Carboxylgruppe abgespalten wird; als eine Vorstufe der Bildung von Carboxylgruppen könnte nun eine teilweise Umwandlung der Hydroxylgruppen in Carbonylgruppen vorausgesetzt werden. Die zunächst gebildeten Aldehyde bzw. Ketone könnten dann als Material zur Bildung der unbeständigen Carboxylgruppen dienen. Andererseits könnten Reduktionsvorgänge zur Bildung des Äthylalkohols führen. Die neuerdings veröffentlichten Untersuchungen von C. Neuberg und L. Karczag¹⁾ zeigen in der Tat, daß in Hefepilzen ein Ferment (Carboxylase) enthalten ist, welches von den Carboxylgruppen CO_2 abspaltet. Auch die reduzierenden Eigenschaften der gärenden Hefe sind ja schon längst bekannt.²⁾ Eine der soeben dargestellten Auffassung analoge Hypothese ist schon längst von W. Löb³⁾ ausgesprochen worden; der genannte Forscher nimmt an, daß die erste Phase der alkoholischen Gärung nichts anderes ist als eine vollkommene Zertrümmerung der Zuckermoleküle unter Bildung von Formaldehyd; dieser Vorgang ist als eine «Lösung der Aldolbindungen» im Zuckermolekül aufzufassen. Aus obiger Darstellung ist ersichtlich, daß ich mich dieser Ansicht im allgemeinen anschließe; doch glaube ich nicht, daß der Spaltungsvorgang so weit fortschreitet, wie es W. Löb

¹⁾ C. Neuberg und L. Karczag. Biochemische Zeitschrift, Bd. 36. S. 68 und 76 (1911).

²⁾ E. Buchner, M. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung. S. 341 (1903).

³⁾ W. Löb, Biochemische Zeitschrift, Bd. 12, S. 78 und 466 (1908); Bd. 17, S. 132 und 343 (1909); Bd. 20, S. 516 (1909); Bd. 22, S. 103 (1909); Bd. 23, S. 10 (1909); Bd. 26, S. 231 (1910).

voraussetzt. Eine ausführlichere Entwicklung all dieser Vorstellungen (die freilich nur als eine Arbeitshypothese anzusehen sind) wird in einer anderen Mitteilung gegeben werden.

Auf Grund der obigen Auseinandersetzungen erscheint es als lohnend, zu versuchen, die etwa intermediär gebildeten Aldehyde durch Polymerisation vor der weiteren Verarbeitung zu schützen. Zu diesem Zwecke habe ich die fermentative alkoholische Gärung in Gegenwart einer geringen Menge von ZnCl_2 in Gang gesetzt; derartige Versuche hatte schon früher W. Löb¹⁾ ausgeführt; der genannte Forscher hat aber andere Aldehyde bindende Mittel, und zwar Ammoniak, Phloroglucin und Anilinwasser verwendet und erhielt durchaus negative Resultate.²⁾ Das Zinkchlorid hat vor den von W. Löb benutzten Stoffen den Vorzug, daß es bereits in sehr geringen Mengen eine kräftige polymerisierende Wirkung auf Aldehyde ausübt.

Für die nachstehend beschriebenen Versuche wurde käufliches Hefanol (von A. Schroder in München) verwendet. Als Antiseptikum benutzte ich Toluol.

Bereits die ersten Versuche ergaben das merkwürdige Resultat, daß ZnCl_2 die CO_2 -Produktion des Hefanols auf Zuckerlösungen außerordentlich stark herabsetzt. Die Untersuchungen von E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn³⁾ über die Wirkung der Mineralsalze auf die Zymasegärung haben dargetan, daß von allen untersuchten Stoffen nur CaCl_2 eine starke hemmende Wirkung auf die CO_2 -Produktion der Preßsäfte ausübt. Nach meinen noch nicht veröffentlichten Versuchen bewirkt auch MgCl_2 eine ungefähr gleich starke Hemmung der CO_2 -Produktion. Der hemmende Einfluß von ZnCl_2 übertrifft jedoch ganz bedeutend denjenigen von CaCl_2 und MgCl_2 , wie es aus nachstehenden Versuchsergebnissen zu ersehen ist. Zu diesen Versuchen wurden Erlenmeyersche Gärrkolben mit Meisslschem

¹⁾ W. Löb, Zeitschr. f. Elektrochemie, Bd. 13, S. 511 (1907).

²⁾ Durch einen glücklichen Zufall war mir diese Arbeit nicht bekannt, als ich meine Untersuchungen eingeleitet habe.

³⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, S. 165 (1903).

Gärverschuß¹⁾ verwendet. Die Salzmengen sind auf wasserfreie Substanz zu beziehen.

4 Gärkölbchen mit folgendem Inhalte:

Kolben A (Kontrolle) 3 g Traubenzucker, 3 g Hefanol, 10 ccm Wasser.

Kolben B 3 g Traubenzucker, 3 g Hefanol, 0,05 g CaCl_2 , 10 ccm Wasser.

Kolben C 3 g Traubenzucker, 3 g Hefanol, 0,05 g MgCl_2 , 10 ccm Wasser.

Kolben D 3 g Traubenzucker, 3 g Hefanol, 0,05 g ZnCl_2 , 10 ccm Wasser.

Ein jedes Kölbchen wurde außerdem mit 1,5 ccm Toluol versetzt. Die Resultate des Versuches sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Zeit in Stunden	Kohlendioxyd in g.			
	A. Wasser	B. CaCl_2	C. MgCl_2	D. ZnCl_2
22	0.19	0.16	0.18	0.06
32	0.26	0.18	0.18	0.05
42	0.37	0.19	0.22	0.02
96	0.82	0.53	0.58	0.13

Die in diesem Versuche verwendeten sehr geringen Mengen von CaCl_2 und MgCl_2 haben die Gärungsenergie nur unbedeutend beeinflußt. Indes hat die gleiche Menge von ZnCl_2 eine un- gemein starke Hemmung der CO_2 -Produktion hervorgerufen. Auf den ersten Blick könnte es erscheinen, daß die so unbedeutende Menge von ZnCl_2 eine Zerstörung der Zymase bewirkt; dies ist aber nicht der Fall: durch die Einwirkung von ZnCl_2 wird die Arbeit der Zymase nur verändert; daß diese Veränderung der Zymaseleistung die Geschwindigkeit des Zuckerzerfalls herabsetzen muß, ist allerdings selbstverständlich. Nach Beendigung des Versuches wurde eine jede Portion mit 100 ccm Wasser versetzt und unter Eiskühlung abdestilliert. Die Destillation wurde so lange fortgesetzt, bis 10 ccm in die Vorlage

¹⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, S. 80 (1903).

übergangen. Die Untersuchung der Destillate ergab, daß nur die in Gegenwart von ZnCl_2 gegorene Portion D Aldehydreaktionen aufwies. Sowohl in diesem als auch in anderen nachstehend beschriebenen Vorversuchen lieferten die Destillate der in Gegenwart von ZnCl_2 gegorenen Portionen folgende Reaktionen: 1. Bildung von Silberspiegel, 2. Rote Färbung mit fuchsin-schwefliger Säure, 3. Blaue Färbung mit einer verdünnten Lösung von Nitroprussidnatrium und Diäthylamin. Letztere Probe ergibt nach Rimini¹⁾ nur mit Acetaldehyd positives Resultat.

Es ist also ersichtlich, daß in Gegenwart von ZnCl_2 tatsächlich Aldehyde entstehen. Durch Anwendung der vorstehend beschriebenen Methode scheint es also möglich zu sein, den fermentativen Vorgang der alkoholischen Gärung durch teilweise Polymerisation der Aldehyde zu verändern und auf diese Weise die Zwischenprodukte der Gärung zu isolieren. Die Ergebnisse des folgenden Versuches zeigen, daß die Hemmung der CO_2 -Produktion des Hefanols durch ZnCl_2 allem Anschein nach nur auf die Polymerisation der Aldehyde, aber nicht auf direkte Schädigung der Gärungsfermente zurückzuführen ist. Es ergab sich, daß gleiche Mengen von ZnCl_2 auch bei verschiedenen Konzentrationen eine ziemlich gleiche Hemmung der CO_2 -Abscheidung bewirken. Ein die Zymase zerstörender Stoff sollte dagegen mit Zunahme der Konzentration eine stärkere Wirkung ausüben.

4 Gärkölbchen mit Meisslschem Verschuß.

A. 3 g Hefanol, 0,05 g ZnCl_2 und 10 ccm Wasser.

B. 3 g Hefanol, 3 g Traubenzucker, 0,05 g ZnCl_2 und 10 ccm Wasser.

C. 3 g Hefanol, 3 g Traubenzucker, 0,05 g ZnCl_2 und 20 ccm Wasser.

D. 3 g Hefanol, 3 g Traubenzucker, 0,05 g ZnCl_2 und 50 ccm Wasser.

Ein jedes Kölbchen wurde mit 1 ccm Toluol versetzt. Die Ergebnisse des Versuches sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

¹⁾ Rimini, Chemisches Zentralblatt. Bd. 69, S. 297 (1898, II).

Zeit in Stunden	Kohlendioxyd in g.			
	A. Wasser + ZnCl ₂ 0,5%	B. Zucker 30% + ZnCl ₂ 0,5%	C. Zucker 15% + ZnCl ₂ 0,25%	D. Zucker 6% + ZnCl ₂ 0,1%
48	0,05	0,09	0,08	0,03
20	0,02	0,03	0,02	0,01
68	0,07	0,12	0,10	0,04

Ein Kontrollversuch mit demselben Hefanolpräparat ergab, daß in Abwesenheit von ZnCl₂ die CO₂-Abscheidung auf 30%iger Traubenzuckerlösung zweimal größer ist als auf 6%iger Traubenzuckerlösung. Bei der Selbstgärung des Hefanols in Gegenwart von ZnCl₂ (Kolben A) wurde sogar eine größere CO₂-Menge gebildet als bei der Gärung auf 6%iger Traubenzuckerlösung. Ein wesentlicher Unterschied bestand aber darin, daß bei der Selbstgärung keine Spur von Aldehyd entstand, während die Destillate der Portionen B, C und D scharfe Aldehydreaktionen zeigten.

Die weitere Untersuchung bezweckte in erster Linie die Aufklärung der chemischen Natur der in Destillat übergehenden flüchtigen Aldehyde. Zunächst wurde die für gute Aldehyd- ausbeute notwendige absolute Menge und Konzentration von ZnCl₂ ermittelt. Die Menge des gebildeten Aldehyds wurde bei diesen Vorversuchen nach der Intensität der Reaktionen mit fuchsinschwefliger Säure bzw. mit Nitroprussidnatriumlösung und Diäthylamin annähernd geschätzt. Dieses auch bei der Spiritusfabrikation gebräuchliche kolorimetrische Verfahren¹⁾ erwies sich für obige Zwecke als vollkommen zureichend. Es ergab sich nun, daß die nötige Menge von ZnCl₂ für verschiedene Hefanolpräparate nicht die gleiche ist; sie muß also für ein jedes Hefanolpräparat durch Vorversuche ermittelt werden. Als ein Muster derartiger Prüfungen sind nachstehend die Ergebnisse mit einem nicht sehr gärkräftigen Hefanolpräparat wiedergegeben. Die Probe mit fuchsinschwefliger Säure ist als Reaktion I, diejenige nach Rimini als Reaktion II bezeichnet.

¹⁾ Paul, Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. 65, S. 647 (1896).

Bei Anwendung der gleichen Mengen von ZnCl_2 , aber verschiedenen Mengen von Wasser ergaben sich folgende Resultate.

A. 10 g Hefanol, 5 g Traubenzucker, 0,1 g ZnCl_2 und 15 ccm Wasser.

B. 10 g Hefanol, 5 g Traubenzucker, 0,1 g ZnCl_2 und 30 ccm Wasser.

C. 10 g Hefanol, 5 g Traubenzucker, 0,1 g ZnCl_2 und 60 ccm Wasser.

D. 10 g Hefanol, 5 g Traubenzucker, 0,1 g ZnCl_2 und 120 ccm Wasser.

Nach Zugabe von je 2 ccm Toluol wurden alle Gärkölbchen 4 Tage ruhig stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Inhalt eines jeden Kolbens auf 120 ccm gebracht und 10 ccm davon unter Eiskühlung abdestilliert. Nach Abscheidung des Toluols wurden die Destillate für Aldehydreaktionen verwendet.

A. Reaktion I schwach; Reaktion II schwach.

B. Reaktion I mittelstark; Reaktion II mittelstark.

C. Reaktion I stark; Reaktion II stark.

D. Reaktion I mittelstark; Reaktion II mittelstark.

Die günstigste Wassermenge ist also: 60 ccm auf je 10 g Hefanol.

Bei Anwendung der gleichen Mengen von Wasser, aber verschiedenen Mengen von ZnCl_2 wurden folgende Resultate erhalten.

A. 10 g Hefanol, 0,2 g ZnCl_2 und 60 ccm Wasser.

B. 10 g Hefanol, 5 g Traubenzucker, 0,1 g ZnCl_2 und 60 ccm Wasser.

C. 10 g Hefanol, 5 g Traubenzucker, 0,2 g ZnCl_2 und 60 ccm Wasser.

D. 10 g Hefanol, 5 g Traubenzucker, 0,3 g ZnCl_2 und 60 ccm Wasser.

Nach Zugabe von je 1 ccm Toluol wurden die Kolben 4 Tage ruhig stehen gelassen. Alsdann wurden dieselben Operationen ausgeführt, die bei der vorstehenden Prüfung in Anwendung kamen.

A. Reaktion I negativ; Reaktion II negativ.

B. Reaktion I stark; Reaktion II stark.

C. Reaktion I stark; Reaktion II sehr stark.

D. Reaktion I sehr schwach; Reaktion II äußerst schwach.

Dieser Versuch zeigt wiederum, daß die Bildung von Aldehyd nur bei Zuckervergärung stattfindet. Die Menge von ZnCl_2 muß genügend groß sein, um eine stürmische Gärung am Anfang des Versuches zu verhindern: eine ausgiebige Schaumbildung zeigt sofort, daß die verwendete Menge von ZnCl_2 unzureichend ist.

Da die nach der obigen Methode erhaltenen Destillate eine scharfe Reaktion mit Nitroprussidnatrium und Diäthylamin liefern, so ist es von vornherein sehr wahrscheinlich, daß in Gegenwart von ZnCl_2 Acetaldehyd entsteht. Bei Anwendung großer Mengen von Hefanol ist es tatsächlich gelungen, den Acetaldehyd nach der Methode von Bamberger¹⁾ als p-Nitrophenylhydrazon abzuscheiden. Die ersten Versuche ergaben jedoch zweifelhafte Resultate, welche darauf zurückzuführen sind, daß die Destillation unter Zusatz einiger Tropfen von Schwefelsäure ausgeführt worden war. Der Zusatz von Schwefelsäure hatte den Zweck, eine möglichst vollständige Depolymerisation des Aldehyds herbeizuführen. Es ergab sich jedoch, daß die in Gegenwart von ZnCl_2 gegorenen Zuckerlösungen eine große Neigung zur Furfurolabspaltung haben; nach der Destillation in Gegenwart von Schwefelsäure erhält man ein Gemisch von Acetaldehyd und Furfurol; hierdurch wird die Reindarstellung des Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazons außerordentlich erschwert. Infolgedessen wurde bei weiteren Versuchen die Destillation ohne Zusatz von Schwefelsäure ausgeführt; die Darstellung des Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazons erwies sich dann als eine leichte Aufgabe. Zu diesem Versuche wurde ein anderes Hefanolpräparat verwendet, bei welchem ein Zusatz von 0,25 g bis 0,3 g ZnCl_2 auf je 10 g Hefanol die besten Resultate lieferte.

20 Gärkölbchen mit je 10 g Hefanol, 10 g Rohrzucker, 0,25 g ZnCl_2 , 50 ccm Wasser und 0,5 ccm Toluol wurden 4 Tage ruhig stehen gelassen; dann wurde der Inhalt sämtlicher Kölbchen vereinigt, in vier Portionen geteilt und eine jede Portion nach

¹⁾ Bamberger. Chemische Berichte, Bd. 32. S. 1806 (1899); Hyde: ebenda. S. 1813.

Zusatz von Wasser unter Eiskühlung abdestilliert. Die vereinigten Destillate (etwa 240 ccm) wurden noch einmal abdestilliert und das letzte Destillat (50 ccm) mit einer klar filtrierten Lösung von 1,5 g p-Nitrophenylhydrazon in 40%iger Essigsäure versetzt. Es bildete sich sofort ein krystallinischer, goldgelber Niederschlag von Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon: derselbe wurde nach einer halben Stunde abgesaugt, mit Wasser mehrmals ausgewaschen, in absolutem Alkohol gelöst, durch Verdünnen mit Wasser wieder abgeschieden, abgesaugt, ausgewaschen und im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Die Ausbeute betrug 0,4917 g.

Die Substanz schmolz bei $127,5^{\circ}$, während ein aus reinem Acetaldehyd dargestelltes Präparat von p-Nitrophenylhydrazon den Schmelzpunkt $128,5^{\circ}$ zeigte. Die Analyse lieferte folgende Resultate:

0,0954 g Substanz gaben 19,1 ccm Stickstoff bei 19° und 766 mm.

0,1217 g Substanz gaben 0,2414 g CO_2 und 0,0606 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$:

N = 23,46%; C = 53,63%; H = 5,03%.

Gefunden:

N = 23,59%; C = 54,10%; H = 5,58%.

Die leichte Reindarstellung des Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazons deutet darauf hin, daß andere flüchtige Aldehyde bei der Gärung nicht entstehen. Beachtenswert ist der Umstand, daß Formaldehyd bei der vorstehend beschriebenen Versuchsanordnung auch in Spuren nicht auftritt. Eine sehr empfindliche Reaktion des Formaldehyds wurde von V. Grafe¹⁾ beschrieben. Versetzt man die zu untersuchende Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen einer 1%igen Lösung von Diphenylamin in konzentrierter Schwefelsäure, die man an der Eproutettenwand vorsichtig herabfließen läßt, so bildet sich bei Anwesenheit von Formaldehyd an der Berührungszone der beiden Flüssigkeiten sofort ein grüner Niederschlag. Diese Probe ist namentlich bei negativem Resultate sehr beweisend, da die

¹⁾ V. Grafe, Österreichische botanische Zeitschrift, Jahrg. 1906, Nr. 8.

Empfindlichkeit der Reaktion nichts zu wünschen übrig läßt. Die Reaktion von Grafe wurde mit allen Destillaten der in Gegenwart von ZnCl_2 gegorenen Zuckerlösungen ausgeführt; daß Resultat war immer ein negatives. Dagegen hatten die Destillate immer saure Reaktion und eine vorläufige Prüfung ließ vermuten, daß Ameisensäure vorhanden war.

Bei schwach alkalischer Reaktion der gärenden Flüssigkeit findet keine Bildung von Acetaldehyd statt, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß alkalisch reagierende Stoffe Aldolbildung hervorrufen; diese Reaktion ist nicht umkehrbar. Dagegen bewirkt ZnCl_2 eine Polymerisation in Paraldehyd bezw. Metaldehyd, welche leicht wieder in 3 Moleküle Acetaldehyd zerfallen. Merkwürdiger ist der Umstand, daß auch bei einer Temperatur von 32° die Bildung von Acetaldehyd unterdrückt wird, wie es z. B. aus folgendem Versuche zu ersehen ist.

12 Gärkolben mit je 10 g Hefanol, 10 g Zucker, 0,25 g ZnCl_2 und 50 ccm Wasser wurden 4 Tage im Thermostaten bei 32° belassen. Die Kolben wurden durch Kautschuckstopfen mit Ableitungsröhren verschlossen und letztere mittels eines Sammelrohres außerhalb des Thermostaten mit einem in Schnee versenkten Kühler in Verbindung gebracht. Gleichzeitig wurden 12 andere Gärkolben mit demselben Inhalt mit einem anderen Kühler verbunden und bei Zimmertemperatur belassen. Das Destillat der bei 32° gegorenen Portionen lieferte nur äußerst schwache Aldehydreaktionen; nach Zugabe von p-Nitrophenylhydrazin erfolgte keine Fällung. Bei Zimmertemperatur hat sich aber eine beträchtliche Menge von Acetaldehyd gebildet: das Destillat gab scharfe Aldehydreaktionen; nach Zusatz von p-Nitrophenylhydrazin fiel sofort ein dicker Niederschlag von Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon aus. In den beiden Kühlern hat sich keine Spur von Acetaldehyd gesammelt; eine nennenswerte Verflüchtigung des Aldehyds aus den Gärkolben findet also nicht statt. Dasselbe Ergebnis lieferten Versuche, bei denen die Gärkolben mit zwei Waschflaschen verbunden waren; die erste Waschflasche wurde mit destilliertem Wasser, die zweite mit einer konzentrierten Lösung von Natriumbisulfit beschickt. Nach Beendigung der Gärung wurde der Inhalt der

Waschflaschen mit einem Überschuß von Natriumcarbonat versetzt und abdestilliert. Das erhaltene Destillat gab keine Aldehydreaktionen, während der Inhalt der Gärkolben eine ziemlich große Menge von Acetaldehyd lieferte.

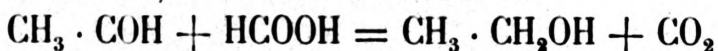
Es liegt hier der erste Fall vor, wo eine primäre Bildung von Acetaldehyd bei der Zuckergärung festgestellt wird, da der bei der Spiritusfabrikation auftretende Aldehyd, der laufenden Vorstellung zufolge, als ein Produkt der Oxydation des bereits gebildeten Äthylalkohols anzusehen ist. Dagegen haben die interessanten Untersuchungen von C. Neuberg und L. Karczag¹⁾ dargetan, daß lebende und getötete Hefen eine Vergärung von Brenztraubensäure und Oxalessigsäure zu Kohlendioxyd und Acetaldehyd bewirken. Ob auch in meinen Versuchen ein analoger Mechanismus der Aldehydbildung anzunehmen ist, bleibt vorläufig dahingestellt; diese Frage kann nur durch ausführliche experimentelle Untersuchungen beantwortet werden. Die weitere Erforschung der in Gegenwart von $ZnCl_2$ stattfindenden Zuckergärung möchte ich mir vorbehalten.

Ist nun Acetaldehyd tatsächlich ein intermediäres Produkt der alkoholischen Gärung? Die Art und Weise der Aldehydbildung in meinen vorstehend beschriebenen Versuchen spricht wohl zugunsten der Annahme, daß Acetaldehyd die vorletzte Stufe der Alkoholbildung vorstellt. Untersuchungen über Alkoholbildung aus Acetaldehyd habe ich bereits eingeleitet und werde darüber in einer anderen Mitteilung berichten; an dieser Stelle muß nur darauf hingewiesen werden, daß die Möglichkeit der Bildung von Äthylalkohol aus Acetaldehyd schon längst von Schade²⁾ hervorgehoben wurde. Der genannte Forscher hat gefunden, daß durch verdünnte Alkalien eine Spaltung der Zuckerarten in Acetaldehyd und Ameisensäure herbeigeführt wird. Bei der alkoholischen Gärung könnte, der Meinung von Schade nach, eine weitere Umwandlung in Äthylalkohol und Kohlendioxyd stattfinden. Die experimentellen Ergebnisse von

¹⁾ C. Neuberg und L. Karczag, Biochemische Zeitschrift, Bd. 36, S. 60, 68 und 76 (1911).

²⁾ Schade, Zeitschrift f. physikalische Chemie, Bd. 57, S. 1 (1906).

Schade wurden zwar in der Folge nicht bestätigt,¹⁾ da aber die Wirkung der Fermente mit derjenigen der Alkalien doch nicht identisch ist, so bleibt das Schema



in betreff der fermentativen Zuckergärung jedenfalls nicht widerlegt. In neuester Zeit haben nun Franzen und Steppuhn²⁾ eine Bildung und teilweise Verarbeitung der Ameisensäure bei der alkoholischen Gärung beobachtet. Die genannten Forscher schließen sich den Ansichten von Schade vollkommen an und setzen voraus, daß Hexosen zunächst in zwei Moleküle von α -Milchsäure zerfallen; weiterhin findet eine Spaltung von α -Milchsäure zu Acetaldehyd und Ameisensäure statt. Nach den Untersuchungen von Nef³⁾ ist tatsächlich nur eine derartige Spaltung der Milchsäure vom chemischen Standpunkte aus möglich, während die von Buchner und Meisenheimer⁴⁾ angenommene direkte Spaltung von α -Milchsäure in Äthylalkohol und Kohlendioxyd den Beobachtungen über die Dissoziation der Milchsäure widerspricht. Diese Annahme wurde auch von den Verfassern selbst schließlich aufgegeben.⁵⁾ In betreff der Bildung von Acetaldehyd bei der Gärung äußern sich Franzen und Steppuhn⁶⁾ folgendermaßen: «Es ist überhaupt nicht wahrscheinlich, daß Acetaldehyd als solcher bei der Zuckerspaltung auftritt, sondern in Form von Derivaten, die keine schädlichen Wirkungen mehr auszuüben brauchen.» Da aber ZnCl_2 eine Polymerisation des freien Acetaldehyds hervorruft, so muß diese Meinung nunmehr modifiziert werden.

Es ist zurzeit nicht möglich, ein bestimmtes Urteil über die soeben dargestellte Theorie zu fällen; doch bin ich mehr

¹⁾ Buchner, Meisenheimer und Schade, Chemische Berichte, Bd. 39, S. 4217 (1906).

²⁾ Franzen und Steppuhn, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 129 (1912); Chemische Berichte, Bd. 44, S. 2915 (1911).

³⁾ Nef, Annalen d. Chemie, Bd. 335, S. 279 (1904).

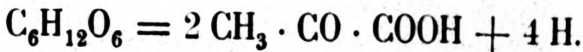
⁴⁾ Buchner und Meisenheimer, Chemische Berichte, Bd. 37, S. 417 (1904); Bd. 38, S. 620 (1905).

⁵⁾ Buchner und Meisenheimer, Chemische Berichte, Bd. 43, S. 1773 (1910).

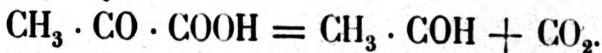
⁶⁾ Franzen und Steppuhn, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 175 (1912).

geneigt zu einer anderen Auffassung der letzten Phase der alkoholischen Gärung. Diese Vorstellung stützt sich auf folgende, jedenfalls nicht ganz unwahrscheinliche Voraussetzungen.

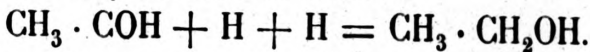
Eine primäre Spaltung der Zuckerarten führt zur Bildung von Brenztraubensäure und labil gebundenem Wasserstoff, den ich, der Einfachheit wegen, in der Gleichung als atomistischen Wasserstoff darstelle.



Bei diesem Vorgang könnte eine intermediäre Bildung von α -Milchsäure vorausgesetzt werden, was ich aber für nicht wahrscheinlich halte. Der Wasserstoff ist selbstverständlich nicht frei, sondern an bestimmte Stoffe (Redukasen) gebunden. Nun erfolgt eine Spaltung der Brenztraubensäure durch die Neubergsche Carboxylase.



Der gebildete Acetaldehyd wird durch den aktiven Wasserstoff sofort zu Äthylalkohol reduziert.



Folgende Überlegungen sprechen zugunsten obiger Voraussetzung.

Sowohl die neueren Untersuchungen von A. Bach¹⁾ als auch ältere Beobachtungen von M. Hahn²⁾ über die Reduktion von Metylenblau durch gärfähige Preßsäfte und Dauerpräparate beweisen, daß die reduzierenden Eigenschaften der Redukasen auf eine Übertragung der Wasserstoffatome zurückzuführen sind. Die soeben erwähnten Versuche von M. Hahn zeigen außerdem, daß zwischen der Gärwirkung und der reduzierenden Wirkung der Hefepreßsäfte und Dauerpräparate ein auffallender Parallelismus besteht.³⁾ Die Anteilnahme der Redukasen am Prozesse der alkoholischen Gärung ist auch wohl niemals bezweifelt

¹⁾ A. Bach, Biochemische Zeitschrift, Bd. 31, S. 443 (1911); Bd. 33, S. 282 (1911); Bd. 38, S. 154 (1912).

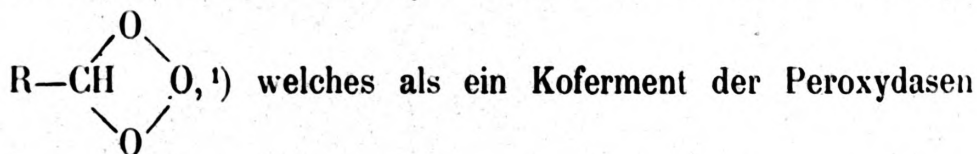
²⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, S. 343.

³⁾ Dasselbe Ergebnis liefern die Untersuchungen von Grüss (Botan. Berichte, Bd. 26 a, S. 191, 1908) und Palladin (Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 81, 1908).

worden. Das vorstehend dargestellte Schema berücksichtigt die Mitwirkung der Redukasen und zwar in der Weise, daß die gegenwärtig allgemein angenommene Vorstellung von dem Mechanismus der Reduktasewirkung in den Gleichungen direkt zum Ausdruck kommt. In anderen Theorien der alkoholischen Gärung wird die Anteilnahme der Redukasen nicht hervorgehoben.

Andererseits liegt die Annahme nahe, daß Carboxylase am Vorgang der Alkoholgärung ebenfalls beteiligt ist. Neuberg und Karczag haben dargetan, daß Carboxylase auch in getöteter Hefe, welche vor der Abtötung mit α -Ketosäuren nicht in Berührung kam, enthalten ist. Die Menge der Carboxylase in Hefezellen ist eine sehr beträchtliche, da die Vergärung der Brenztraubensäure mit eben derselben Geschwindigkeit wie die Zuckervergärung stattfindet. Nun wäre vom biologischen Standpunkte aus das Vorhandensein so erheblicher Mengen eines unter normalen Verhältnissen unnötigen Fermentes äußerst unwahrscheinlich. Zum Schluß will ich jedoch nochmals betonen, daß obige Hypothese von mir mit aller Reserve ausgesprochen wird und nur als Leitgedanke für weitere Untersuchungen dienen soll.

Sollte es sich erweisen, daß Acetaldehyd kein Zwischenprodukt der Alkoholbildung vorstellt, so würde die biologische Bildung von Acetaldehyd aus Zucker nichtdestoweniger beachtenswert bleiben. Da die alkoholische Gärung bei den meisten Pflanzen als die erste Phase der Sauerstoffatmung anzusehen ist, so kann Acetaldehyd in den meisten Pflanzen durch fermentative Reaktion aus Zuckerarten entstehen. Die Antoxydation eines Aldehyds liefert aber immer ein Moloxyd



dienen kann. Andererseits bildet Acetaldehyd, nach den inter-

¹⁾ Erlenmeyer, Chemische Berichte, Bd. 27, S. 1959 (1894); Bach, Moniteur scientifique (4), Bd. 11 (II), S. 479 (1897); Engler und Weissberg, Kritische Stud. über die Vorgänge der Antoxydation, S. 90 (1904); Luther und Schilow, Zeitschr. f. physikalische Chemie, Bd. 46, S. 811 (1903).

essanten Untersuchungen von A. Bach,¹⁾ ein Koferment der Redukasen. Außerdem sind verschiedene, äußerst wichtige vitale Umwandlungen der Kohlenhydrate in Pflanzen durch die Annahme der primären Bildung von Acetaldehyd aus Zucker erklärlich. H. Euler²⁾ nimmt an, daß die Fettsynthese aus Zucker erst nach der Zymasespaltung des Zuckers zu Acetaldehyd erfolgt; dieselbe Bildungsweise wird von H. Euler³⁾ für Terpene und organische Säuren, die ja ebenfalls aus Zucker entstehen, vorausgesetzt. Die Bildung der dreibasischen Citronensäure und Aconitsäure mit verzweigter Kohlenstoffkette ist Eulers Meinung nach überhaupt nur durch die Annahme einer Rekonstruktion der Kohlenstoffkette über Acetaldehyd verständlich. Diese zunächst nur rein theoretischen Voraussetzungen gewinnen nunmehr eine experimentelle Grundlage.

Schließlich muß darauf aufmerksam gemacht werden, daß die in der vorliegenden Mitteilung beschriebene Methode zum erstenmal die Möglichkeit gegeben hat, den Chemismus einer fermentativen Reaktion durch künstliche Eingriffe qualitativ zu verändern.

¹⁾ A. Bach, Biochem. Zeitschrift, Bd. 31, S. 443 (1911); Bd. 33, S. 282 (1911); Bd. 38, S. 154 (1912).

²⁾ H. Euler, Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, Teil III, S. 212 (1909).

³⁾ H. Euler, Ebenda, S. 219 und 182.