

Über Alkoholgärung.

Von

S. Kostytschew.

II. Mitteilung.

Über Bildung von Äthylalkohol aus Acetaldehyd durch lebende und getötete Hefe.

Von

S. Kostytschew und E. Hübbenet.

(Aus dem botanischen Laboratorium des Technologischen Instituts und der Frauenhochkurse in St. Petersburg.)

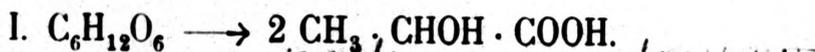
(Der Redaktion zugegangen am 30. Mai 1912.)

In der ersten Mitteilung wurde gezeigt, daß bei der Zuckervergärung durch käufliches Hefanol in Gegenwart geringer Mengen von Zinkchlorid Acetaldehyd entsteht.¹⁾ Da Zinkchlorid bekanntlich eine Polymerisation des Acetaldehyds in Paraldehyd bezw. Metaldehyd bewirkt, so ist die Annahme naheliegend, daß Acetaldehyd auch bei normaler Zuckergärung vorübergehend entsteht und durch die polymerisierende Wirkung von $ZnCl_2$ nur vor der weiteren Verarbeitung zum Teil geschützt wird. Es ist außerdem schon längst bekannt, daß gärende Hefe stark reduzierende Eigenschaften aufweist. Auf Grund dieser Betrachtungen ist es ziemlich wahrscheinlich, daß Acetaldehyd ein intermediäres Produkt der Alkoholbildung vorstellt. Sollte es tatsächlich der Fall sein, so wären folgende Möglichkeiten der Anteilnahme des Acetaldehyds am Gärungsvorgange in erster Linie zu erwähnen.

1. Das Schema von Schade.²⁾ Eine primäre Zuckerspaltung führt zur Bildung von zwei Molekülen α -Milchsäure.

¹⁾ Es ergab sich nachträglich, daß die Aldehydausbeute noch bedeutend gesteigert werden kann, wenn man anstatt Hefanol die «trockene Dauerhefe nach v. Lebedew» (käufliches Präparat) verwendet.

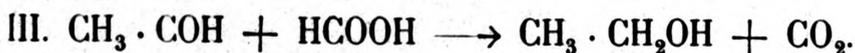
²⁾ Schade, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. 57, S. 1 (1907).



Es ist ohne weiteres ersichtlich, daß diese Umwandlung einen ziemlich komplizierten Vorgang vorstellen muß. An dieser Stelle wollen wir jedoch nur die letzte Phase der Gärung eingehend betrachten. Die α -Milchsäure wird zu Acetaldehyd und Ameisensäure verarbeitet.

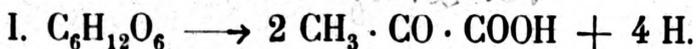


Schließlich wird Acetaldehyd durch Ameisensäure zu Äthylalkohol reduziert.



Der Umstand, daß α -Milchsäure zu Äthylalkohol und Kohlendioxyd nicht vergoren werden kann,¹⁾ spricht wohl nicht zu Gunsten der Schadeschen Theorie. Auch wurde eine fermentative Bildung von Acetaldehyd und Ameisensäure aus α -Milchsäure noch niemals wahrgenommen. Die Auseinandersetzungen von Franzen und Steppuhn²⁾ zeigen zwar, daß ein Versuch, die intermediären Gärungsprodukte zu vergären, unter Umständen versagen kann, doch verfügen wir leider über keine anderen Mittel, einen bei der Gärung auftretenden Stoff als intermediäres Gärungsprodukt zu identifizieren.

2. In der ersten Mitteilung³⁾ wurde die Ansicht entwickelt, daß Äthylalkohol durch einen anderen Reduktionsvorgang aus Acetaldehyd entstehen kann. Die primäre Zuckerspaltung führt zur Bildung von zwei Molekülen Brenztraubensäure und aktivem Wasserstoff.



Bei diesem komplizierten Vorgange wäre nach den Auseinandersetzungen von A. Bach⁴⁾ eine Wasserspaltung unter Bildung von Oxyperhydrid anzunehmen. Weiterhin lagert sich der Wasserstoff an Wasserstoff aktivierende Stoffe (Redukasen) an. Nun erfolgt eine Spaltung der Brenztraubensäure durch Carboxylase. Nach den Untersuchungen von C. Neuberg und

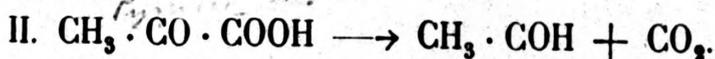
¹⁾ Buchner und Meisenheimer, Chem. Berichte, Bd. 43, S. 1773 (1910).

²⁾ Franzen und Steppuhn, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 181 (1912).

³⁾ S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, H. 1/2.

⁴⁾ A. Bach, Biochemische Zeitschrift, Bd. 31, S. 447 (1911).

L. Karczag¹⁾ wird diese Spaltung der Brenztraubensäure sowohl durch lebende als auch durch getötete Hefen mit großer Energie bewirkt.



Der gebildete Acetaldehyd wird beim normalen Verlauf der Gärung durch den aktiven Wasserstoff sofort zu Äthylalkohol reduziert.



Diese Theorie berücksichtigt also die Anteilnahme der Redukasen am Gärungsprozesse. Die große Bedeutung der Redukasen bei der alkoholischen Gärung wurde schon längst durch M. Hahn,²⁾ Grüss³⁾ und Palladin⁴⁾ hervorgehoben. In obigen Gleichungen ist die Redukasewirkung als eine Übertragung der Wasserstoffatome dargestellt, was auch sowohl den älteren experimentellen Ergebnissen²⁾ als den modernen Anschauungen⁵⁾ vollkommen entspricht. Andererseits ist die Gleichung II experimentell begründet, während eine biologische Spaltung von Milchsäure zu Acetaldehyd und Ameisensäure vollkommen hypothetisch bleibt.

Bereits während des Niederschreibens dieser Zeilen ist uns die soeben veröffentlichte Mitteilung von C. Neuberg und J. Kerb⁶⁾ bekannt geworden. Die genannten Forscher neigen sich ebenfalls zu der Voraussetzung, daß Brenztraubensäure ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung ist, während die Schadesche Theorie experimentell nicht bestätigt werden konnte. Bei der Vergärung von Brenztraubensäure allein läßt sich zwar Äthylalkohol nicht nachweisen, doch lieferte die Vergärung von einem Gemisch äquimolekularer Mengen von

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

²⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, S. 343 (1903).

³⁾ Grüss, Botanische Berichte, Bd. 26 a, S. 191 (1908).

⁴⁾ W. Palladin, Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 84 (1908).

⁵⁾ A. Bach, Biochemische Zeitschrift, Bd. 31, S. 443 (1911); Bd. 33, S. 282 (1911); Bd. 38, S. 154 (1912).

⁶⁾ C. Neuberg und J. Kerb, Zeitschrift für Gärungsphysiologie. Bd. 1, S. 114 (Maiheft 1912).

Brenztraubensäure und Glycerin eine bedeutend größere Alkoholmenge, als sie der Selbstgärung der Hefe entsprechen sollte; dieser Versuch gelingt jedoch nur bei Anwendung sehr beträchtlicher Hefemenge (4,5 kg). Andererseits entsteht kein Alkohol bei Vergärung von Brenztraubensäure in Gegenwart von Ameisensäure.

Bei der Betrachtung der Versuchsergebnisse von Neuberg und Kerb könnte man aber den Eindruck bekommen, daß Acetaldehyd überhaupt kein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung vorstellt, und daß der bei Vergärung von Brenztraubensäure + Glycerin¹⁾ auftretende Äthylalkohol nicht durch Reduktion des primär gebildeten Acetaldehyds, sondern durch eine tiefgreifende Veränderung des gesamten Gärungsvorganges entsteht. Zugunsten dieser Voraussetzung spricht nämlich der Umstand, daß Versuche der Verfasser, eine direkte Reduktion des Acetaldehyds durch Hefe in Gegenwart von Formiaten zu bewirken, durchaus negative Resultate ergaben. Der Acetaldehyd wurde in Form von Aldehydammoniak verwendet. Bereits früher erhielten auch Buchner und Meisenheimer²⁾ negative Resultate mit Äthylidenoxyformiat $\text{CH}_3 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{O} \cdot \text{CHO}$.

In der ersten Mitteilung habe ich jedoch dargetan,³⁾ daß die Polymerisation des Aldehyds eine weitere Verarbeitung bereits verhindert; es liegt also die Annahme nahe, daß die von den genannten Forschern verwendeten Verbindungen ebenfalls unangreifbar sind. Diese Überlegungen zeigen, daß nur der freie Acetaldehyd als Material für die Reduktion verwendet werden muß. Franzen und Steppuhn⁴⁾ haben zwar gefunden, daß verschiedene Heferassen auf $n/200$ -Acetaldehydlösungen nicht zum Wachstum zu bringen sind, die Ergebnisse von Neuberg und Karczag⁵⁾ zeigen jedoch, daß erwachsene

¹⁾ Bei normaler alkoholischer Gärung wird nach Neuberg das System Brenztraubensäure + Acetol vergoren.

²⁾ E. Buchner und J. Meisenheimer, Chemische Berichte, Bd. 43, S. 1794 (1910).

³⁾ S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, H. 1/2.

⁴⁾ Franzen und Steppuhn, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 175 (1912).

⁵⁾ C. Neuberg und L. Karczag, Biochemische Zeitschrift, Bd. 36, S. 60, 68, 76 (1911).

Hefezellen ziemlich große Mengen von Acetaldehyd vertragen können.

Die nachstehend beschriebenen Versuche hatten den Zweck, zu erforschen, ob der freie Acetaldehyd durch lebende und getötete Hefen zu Äthylalkohol reduziert werden kann und ob die genannte Reduktion des Acetaldehyds nur in Gegenwart von Ameisensäure zustandekommt, wie es nach dem Schadeschen Schema der Fall sein sollte. Die Untersuchungen wurden mit lebender Preßhefe, trockener Hefe nach v. Lebedew,¹⁾ Hefanol, Zymin und Macerationssaft nach v. Lebedew¹⁾ ausgeführt. Da größere Mengen von Acetaldehyd lebende Hefezellen vergiften und in getöteter Hefe bzw. in Hefesaft eine Denaturierung der Eiweißstoffe hervorrufen, so wurde der Aldehyd in kleinen Portionen allmählich hinzugefügt. Nach Beendigung der Gärung wurde der Inhalt der Gärkolben abdestilliert und das erhaltene Destillat durch wiederholte Destillationen eingengt. Die Abscheidung des überschüssigen Acetaldehyds geschah auf folgende Weise: Das vorher von etwa vorhandener Ameisensäure befreite Destillat wurde mit Natriumbisulfit versetzt und nach einiger Zeit vorsichtig abdestilliert; hierbei wird der Acetaldehyd als Natriumbisulfitverbindung zurückgehalten; man hat nur dafür zu sorgen, daß nicht mehr als die Hälfte der Flüssigkeit in die Vorlage übergeht. Das erhaltene Destillat wurde von schwefliger Säure durch eine andere Destillation, unter Zusatz von Natriumcarbonat, befreit. Waren alsdann die Aldehydreaktionen nicht vollkommen verschwunden, so wurde die Bearbeitung mit Natriumbisulfit wiederholt. Das zuletzt erhaltene Destillat war dann vollkommen frei von Acetaldehyd und konnte für quantitative Alkoholbestimmung verwendet werden. Kontrollversuche ergaben, daß eine Reduktion des Acetaldehyds bei obiger Behandlung durchaus ausgeschlossen ist. Die Alkoholbestimmungen wurden mit Hilfe eines genauen mehr als 35 ccm fassenden Ostwaldschen Pyknometers ausgeführt.

¹⁾ A. v. Lebedew, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 447 (1911).

Versuche mit Preßhefe.

Versuch 1.

Zwei Kolben mit je 50 g Preßhefe und 500 ccm Wasser wurden 22 Stunden stehen gelassen. Der Kolben A wurde dreimal mit je 10 ccm einer $n/2$ -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure versetzt. Im ganzen wurden also 660 mg Acetaldehyd zugegeben. Der Kontrollkolben B wurde mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt. Die Alkoholbestimmungen ergaben folgende Resultate:

Kolben A.	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 539 \text{ mg}$
» B.	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 207 \text{ »}$
	Differenz = 332 mg.

Versuch 2.

100 g Preßhefe wurden mit 200 ccm Wasser versetzt und 31 Stunden in aller Ruhe belassen, dann abfiltriert, ausgewaschen, mit 1 l Wasser angerührt und in zwei gleiche Portionen zu je 500 ccm geteilt. Portion A wurde mit 15 ccm einer $n/2$ -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure, Portion B mit 15 ccm Wasser versetzt. Nach 10 Stunden wurden die gleichen Zusätze noch einmal gemacht. Nach weiteren 7 Stunden wurde der Versuch unterbrochen. Die Portion A erhielt 660 mg Acetaldehyd.

A.	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 351 \text{ mg}$
B.	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 108 \text{ »}$
	Differenz = 243 mg.

Versuch 3.

Genaue Wiederholung des vorstehenden Versuchs; die Versuchsdauer betrug aber 22 Stunden.

A.	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 341 \text{ mg}$
B.	$\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 117 \text{ »}$
	Differenz = 224 mg.

Auch bedeutend geringere Hefemengen bewirken eine deutliche Reduktion des Acetaldehyds, wie aus folgendem Versuche zu ersehen ist.

Versuch 4.

2 Kolben mit je 15 g Preßhefe und 200 ccm Wasser erhielten folgende Zusätze.

Kolben A. Drei Portionen zu je 5 ccm einer $n/2$ -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure. Aldehydzusatz 330 mg.

Kolben B. Drei Portionen Wasser zu je 5 ccm. Versuchsdauer 23 Stunden.

$$\text{A. CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 143 \text{ mg}$$

$$\text{B. CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 90 \text{ »}$$

$$\text{Differenz} = 53 \text{ mg.}$$

Es ergab sich also, daß Preßhefe immer eine deutliche Reduktion des Acetaldehyds bewirkt; die mit Aldehyd und Ameisensäure versetzten Kolben bildeten eine bedeutend größere Alkoholmenge, als sie durch Selbstgärung geliefert werden könnte. Nun ist eine derartige Aldehydreduktion nach dem Schadeschen Schema nur in Gegenwart von Ameisensäure möglich. Folgende Versuche zeigen jedoch, daß die Reduktion von Acetaldehyd ebensogut bei Abwesenheit von Ameisensäure erfolgt.

Versuch 5.

Zwei Kolben mit je 50 g Preßhefe und 500 ccm Wasser erhielten folgende Zusätze.

Kolben A. 26 ccm $n/2$ -Acetaldehydlösung (572 mg Acetaldehyd) in mehreren Portionen.

Kolben B. 26 ccm Wasser.

Versuchsdauer 21 Stunden.

$$\text{A. CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 373 \text{ mg}$$

$$\text{B. CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 96 \text{ »}$$

$$\text{Differenz} = 277 \text{ mg.}$$

Versuch 6.

Drei Kolben mit je 50 g Preßhefe und 500 ccm Wasser erhielten folgende Zusätze.

Kolben A. 15 ccm $n/2$ -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure.

Kolben B. 15 ccm $n/2$ -Lösung von Acetaldehyd allein.
 Kolben C. 15 ccm Wasser.

Nach 10 Stunden wurden wiederum die gleichen Zusätze gemacht. Die Kolben A und B erhielten je 660 mg Acetaldehyd. Versuchsdauer 21 Stunden.

$$A. \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 525 \text{ mg}$$

$$B. \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 490 \text{ »}$$

$$C. \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 225 \text{ »}$$

Versuch 7.

Wiederholung des vorstehenden Versuches. Versuchsdauer 20 Stunden.

$$A. \text{Acetaldehyd} + \text{Ameisensäure} \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 668 \text{ mg}$$

$$B. \text{Acetaldehyd allein} \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 541 \text{ »}$$

$$C. \text{Wasser} \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 211 \text{ »}$$

In allen vorstehend beschriebenen Versuchen wurde also eine deutliche Zunahme der Alkoholmenge in den mit Acetaldehyd und Ameisensäure oder mit Acetaldehyd allein versetzten Kolben wahrgenommen. Daß die bei der Reduktion des Acetaldehyds entstehende flüchtige Substanz tatsächlich Äthylalkohol ist, wurde auf folgende Weise bewiesen.

Die Destillate der mit Acetaldehyd und Ameisensäure versetzten Portionen der Versuche 1, 2, 3 und 6 wurden vereinigt, durch wiederholte Destillation auf ein möglichst kleines Volumen gebracht und für Darstellung von Äthylalkohol verwendet. Auf Grund der pyknometrischen Bestimmungen muß die gesamte Alkoholmenge der genannten Portionen gleich $0,539 + 0,351 + 0,341 + 0,525 = 1,756 \text{ g}$ sein. Ein Teil der Destillate wurde zwar schon früher für Aldehydreaktionen, behufs Kontrolle der Vollkommenheit der Abscheidung von Acetaldehyd, verwendet, doch wurde immerhin durch entwässerte Potasche 1,53 g absoluter Alkohol vom richtigen Siedepunkt $78,5^\circ$ isoliert, während die Gesamtheit der entsprechenden Kontrollportionen (auf Wasser) nur $0,207 + 0,108 + 0,117 + 0,225 = 0,657 \text{ g}$ Alkohol enthalten konnte. Das erhaltene Produkt wurde in p-Nitrobenzoesäureäthylester übergeführt und letzterer

durch Mischprobe identifiziert. 1,32 g Alkohol wurde mit der entsprechenden Menge von p-Nitrobenzoylchlorid am Rückflußkühler erwärmt, das Rohprodukt in Benzol gelöst, zur Abscheidung von HCl, Überschuß von p-Nitrobenzoylchlorid und p-Nitrobenzoesäure mit Natronlauge ausgeschüttelt, die Benzollösung im Scheidetrichter abgetrennt und durch Verdunsten zur Krystallisation gebracht; zur völligen Reinigung wurde der Ester noch einmal aus Alkohol umkrystallisiert.¹⁾ Die Ausbeute betrug 4,1 g.

Der erhaltene p-Nitrobenzoesäureäthylester zeigte den richtigen Schmelzpunkt 57°; nach Zusatz von reinem p-Nitrobenzoesäureäthylester ist der Schmelzpunkt der Mischung gleich 57° geblieben.

Es ist also ersichtlich, daß in Gegenwart von Acetaldehyd eine deutliche Zunahme der Alkoholproduktion durch Preßhefe stattfindet. Der Umstand, daß Acetaldehyd nur langsam und unvollkommen reduziert wird, ist leicht begreiflich: nach Zugabe von Aldehyd hat sich die Menge des zu reduzierenden Produktes vergrößert, während das reduzierende Vermögen der Hefe nicht gesteigert wurde. Wenn man nach Zugabe von Acetaldehyd von Zeit zu Zeit kleine Proben der Flüssigkeit entnimmt und mit fuchsinschwefliger Säure versetzt, so kann man ziemlich gut beobachten, daß die erste Portion von Acetaldehyd nach wenigen Stunden beinahe vollkommen reduziert wird; nach Zusatz der zweiten Aldehydportion ist die Aldehydreaktion nicht mehr zum Verschwinden zu bringen; nach weiteren Aldehydzusätzen wird die Rotfärbung mit fuchsinschwefliger Säure immer schärfer. Dies zeigt, daß die reduzierende Tätigkeit der Hefe allmählich erlischt.

Die mit lebender Preßhefe erhaltenen Resultate wurden durch Versuche mit Hefanol, Zymin und trockener Hefe nach

¹⁾ Bei dieser Methode wird möglicherweise ein geringer Teil des Esters durch Natronlauge verseift, aber die Reindarstellung des Produktes wesentlich erleichtert, da der p-Benzoesäureäthylester namentlich aus absolutem Alkohol vorzüglich auskrystallisiert; die Verwendung von absolutem Alkohol ist selbstverständlich nur nach Entfernung des überschüssigen p-Nitrobenzoylchlorids ohne Bedenken zulässig. Wasserhaltigen Alkohol kann man ohne Trocknen nach Schotten-Baumann verestern.

v. Lebedew » im allgemeinen bestätigt; das reduzierende Vermögen der genannten Präparate steht allerdings demjenigen der lebenden Hefe nach. Die nach v. Lebedew getrocknete Hefe zeigte außerdem eine starke Selbstgärung. Als Antiseptikum verwendeten wir immer Toluol, welches sich mit Wasser nicht mischt und folglich leicht abgetrennt werden kann.

Versuche mit Hefanol.

Versuch 8.

2 Kolben mit je 25 g Hefanol und 150 ccm Wasser erhielten folgende Zusätze:

Kolben A. Sechs kleine Portionen einer $n/10$ -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure. Aldehydzusatz 330 mg.

Kolben B. Gleiche Menge von destilliertem Wasser. Versuchsdauer 38 Stunden.

$$\text{A. } \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 377 \text{ mg}$$

$$\text{B. } \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 245 \text{ »}$$

$$\text{Differenz} = 132 \text{ »}$$

Versuch 9.

3 Kolben mit je 25 g Hefanol und 150 ccm Wasser erhielten folgende Zusätze:

Kolben A und B. Je 55 ccm einer $n/10$ -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure (in fünf Portionen; Aldehydmenge 242 mg auf je einen Kolben).

Kolben C. 55 ccm Wasser. Versuchsdauer 39 Stunden.

$$\text{A. } \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 296 \text{ mg}$$

$$\text{B. } \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 306 \text{ »}$$

$$\text{C. } \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 231 \text{ »}$$

Dieser Versuch zeigt, daß die mit gleichen Mengen von Acetaldehyd und Ameisensäure versetzten Portionen vollkommen gleiche Alkoholmengen bilden. Dasselbe Resultat ergibt sich aber auch in dem Falle, wenn die eine Portion nur mit Acetaldehyd allein behandelt wird.

Versuch 10.

Drei Kolben mit je 25 g Hefanol und 150 ccm Wasser erhielten folgende Zusätze:

Kolben A. 55 ccm n_{10} -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure (in vier Portionen); Aldehydmenge = 242 mg.

Kolben B. 55 ccm n_{10} -Acetaldehydlösung (in vier Portionen). Aldehydmenge = 242 mg.

Kolben C. 55 ccm Wasser (in vier Portionen). Versuchsdauer 28 Stunden.

A. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 299 \text{ mg}$

B. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 300 \text{ } \text{>}$

C. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 160 \text{ } \text{>}$

In Gegenwart und bei Abwesenheit von Ameisensäure wurden also gleiche Mengen von Acetaldehyd zu Äthylalkohol reduziert. Auch im folgenden Versuche hat eine Reduktion von Acetaldehyd bei Abwesenheit von Ameisensäure stattgefunden.

Versuch 11.

Zwei Kolben mit je 25 g Hefanol und 150 ccm Wasser erhielten folgende Zusätze:

Kolben A. Mehrere Portionen von n_{10} -Acetaldehydlösung, im ganzen 90 ccm. Aldehydzusatz 396 mg.

Kolben B. 90 ccm Wasser. Versuchsdauer 22 Stunden.

A. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 380 \text{ mg}$

B. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 130 \text{ } \text{>}$

Differenz = 250 $\text{ } \text{>}$

Versuch mit Zymin.

Versuch 12.

2 Kolben mit je 25 g Zymin (glykogenarm) und 150 ccm Wasser erhielten folgende Zusätze:

Kolben A. Vier Portionen einer n_{10} -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure zu je 10 ccm Aldehydzusatz 176 mg.

Kolben B. 40 ccm Wasser. Versuchsdauer 48 Stunden.

A. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 207 \text{ mg}$

B. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 110 \text{ } \text{>}$

Differenz = 97 $\text{ } \text{>}$

Versuche mit trockener Hefe nach v. Lebedew.**Versuch 13.**

Drei Kolben mit je 50 g trockener Hefe (nach v. Lebedew) und 465 ccm Wasser (ohne Toluol) erhielten folgende Zusätze:

Kolben A. 45 ccm einer $n/2$ -Lösung von Acetaldehyd + Ameisensäure in drei Portionen zu je 15 ccm Aldehydzusatz 990 mg.

Kolben B. 45 ccm einer $n/2$ -Lösung von Acetaldehyd allein in drei Portionen zu je 15 ccm Aldehydzusatz 990 mg.

Kolben C. 45 ccm Wasser in drei Portionen zu je 15 ccm. Versuchsdauer 24 Stunden.

A. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 821 \text{ mg}$

B. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 1159 \text{ } >$

C. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 727 \text{ } >$

Versuche mit Macerationshefesaft.

Der Saft wurde nach der Vorschrift von A. v. Lebedew¹⁾ aus getrockneter Hefe dargestellt. Sämtliche Angaben des genannten Forschers haben sich bestätigt. Der Saft vergärt mit großer Energie Traubenzucker und Rohrzucker, zeigt aber keine Selbstgärung. Da ohne Zuckerzusatz Kohlendioxyd vom Saft nicht gebildet wird, so ist es einleuchtend, daß auch die Alkoholproduktion vollkommen ausbleibt. Trotzdem ist der Saft immer alkoholhaltig; dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß während des zweistündigen Aufbewahrens im Thermostaten bei 32° eine gewisse Alkoholmenge durch Selbstgärung der «trockenen Hefe» entsteht.

Während alle übrigen Hefepräparate eine deutliche Reduktion von Acetaldehyd hervorgerufen haben, wurde in Versuchen mit dem nicht gärenden Macerationssaft nach Zusatz von Acetaldehyd allein oder von Acetaldehyd und Ameisensäure keine merkliche Zunahme von Alkohol wahrgenommen. Es scheint also, daß die Reduktion von Acetaldehyd nicht auf Kosten von Ameisensäure stattfindet.

¹⁾ A. v. Lebedew, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 447 (1911).

Versuch 14.

Drei Kölbchen mit je 32 ccm Macerationssaft erhielten folgende Zusätze:

Kolben A. 110 mg Acetaldehyd und 115 mg Ameisensäure (in 5 Portionen).

Kolben B. 110 mg Acetaldehyd (in 5 Portionen zu je 1 ccm $n/2$ -Lösung).

Kolben C. 5 ccm Wasser.

Versuchsdauer 18 Stunden.

A. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 78 \text{ mg}$

B. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 104 \text{ ,}$

C. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 80 \text{ ,}$

Versuch 15.

Drei Kölbchen mit je 25 ccm Macerationssaft (aus «trockener Hefe») erhielten folgende Zusätze:

Kolben A. 143 mg Acetaldehyd und 149,5 mg Ameisensäure (in 6 Portionen).

Kolben B. 143 mg Acetaldehyd ($n/2$ -Lösung).

Kolben C. 6,5 ccm Wasser.

Versuchsdauer 53 Stunden.

A. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 99 \text{ mg}$

B. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 84 \text{ ,}$

C. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 93 \text{ ,}$

M. Hahn¹⁾ hat schon längst gefunden, daß zwischen der Gärwirkung und der Reduktionswirkung des Hefepreßsaftes und der Dauerhefe für Methylenblau ein auffallender Parallelismus besteht. Nun zeigt der Macerationssaft gar keine Selbstgärung. Wenn wir nach meinem obigen Schema annehmen, daß Äthylalkohol durch eine Reaktion zwischen Acetaldehyd und wasserstoffübertragenden Stoffen entsteht, so können wir leicht begreifen, daß in Gegenwart von nur einer der beiden notwendigen Komponenten keine Alkoholbildung möglich ist. Auch Neuberg und Kerb²⁾ haben gefunden, daß bei Vergärung von Brenz-

¹⁾ E. Buchner, H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, S. 343 (1903).

²⁾ Neuberg und Kerb, l. c.

traubensäure in Gegenwart von Ameisensäure kein Alkohol entsteht. Hier liegt offenbar ein vollkommen analoger Fall vor, da bei der Gärung von Brenztraubensäure die Selbstgärung unterdrückt wird, wie es Neuberg und Karczag¹⁾ bereits früher hervorgehoben haben; die Ameisensäure erweist sich aber als unwirksam.

Wird nun der Macerationssaft mit Zucker versetzt, so erhält er, wie zu erwarten war, sofort die Fähigkeit, Acetaldehyd bei Abwesenheit von Ameisensäure zu reduzieren. In folgenden Versuchen wurde der Saft mit nur ganz geringen Zuckermengen versetzt; dies genügte aber zu einer Reduktion des Acetaldehyds. Sehr beachtenswert ist der Umstand, daß die Zunahme der Alkoholproduktion von einer Steigerung der CO₂-Abscheidung nicht begleitet war.

Versuch 16.

5 Gärkölbchen mit je 32 ccm Macerationssaft erhielten folgende Zusätze.

Kolben A. 110 mg Acetaldehyd und 115 mg Ameisensäure in fünf Portionen.

Kolben B. 110 mg Acetaldehyd in fünf Portionen.

Kolben C. Das gleiche Volumen von Wasser.

Kolben D. 1 g Traubenzucker (am Anfang des Versuches) und 264 mg Acetaldehyd (sechs Portionen).

Kolben E. 1 g Traubenzucker (am Anfang des Versuches) und sechs Portionen Wasser.

Die Kölbchen wurden mit Meisslschem Gärverschluß versehen. Versuchsdauer 39 Stunden.

CO₂-Bestimmungen.

Zeit in Stunden	Kohlendioxyd in g				
	A	B	C	D	E
17	0	0	0	0,32	0,33
8	0	0	0	0,05	0,05
14	0	0	0	0,04	0,02
39	0	0	0	0,41	0,40

¹⁾ C. Neuberg und L. Karczag, Biochemische Zeitschrift, Bd. 36, S. 61 und 65 (1911).

Alkoholbestimmungen.

A. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 117 \text{ mg}$

B. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 128 \text{ } \cdot$

C. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 106 \text{ } \cdot$

D. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 662 \text{ } \cdot$

E. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 516 \text{ } \cdot$

Die Portion E hat 0,40 g Kohlendioxyd und 0,41 g Alkohol (nach Abzug der im Saft bereits vorhandenen Alkoholmenge) gebildet. Die mit Acetaldehyd versetzte Portion D zeigte aber eine Mehrproduktion von 146 mg Alkohol.

Versuch 17.

Zwei Kölbchen mit je 38 ccm Macerationssaft erhielten folgende Zusätze:

Kolben A. 528 mg Acetaldehyd in drei Portionen und 1 g Traubenzucker (am Anfang des Versuches).

Kolben B. 12 ccm Wasser in drei Portionen und 1 g Traubenzucker (am Anfang des Versuches). Versuchsdauer 39 Stunden.

Im Verlaufe der anfänglichen 6 Stunden wurde CO_2 nicht bestimmt. Späterhin wurden von den beiden Portionen gleiche CO_2 -Mengen gebildet.

$$\begin{array}{l} \text{In 24 Stunden} \\ \text{In 9 Stunden} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{A. } \text{CO}_2 = 0,19 \text{ g} \\ \text{B. } \text{CO}_2 = 0,19 \text{ } \cdot \\ \text{A. } \text{CO}_2 = 0,02 \text{ g} \\ \text{B. } \text{CO}_2 = 0,03 \text{ } \cdot \end{array} \right.$$

Alkoholbestimmungen.

A. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 574 \text{ mg}$

B. $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2\text{OH} = 394 \text{ } \cdot$

Differenz = 180 \cdot

Die Gesamtheit der in der vorliegenden Mitteilung beschriebenen Versuche zeigt also, daß geringe Mengen von Acetaldehyd bei allmählicher Zugabe sowohl durch lebende, als auch durch getötete Hefe zu Äthylalkohol reduziert werden.

Welchen Forderungen muß ^{Genügnung} Genügnung gewährt werden, damit ein bestimmter Stoff als intermediäres Produkt der alkoholischen Gärung erkannt werden kann? Der fragliche Stoff muß:

1. Bei der Zuckergärung gebildet werden.

2. Durch lebende oder getötete Hefe unter Alkoholbildung verarbeitet werden können.

Diese Bedingungen sind bisher nur für Acetaldehyd erfüllt, indem in der ersten Mitteilung¹⁾ das Auftreten von Acetaldehyd bei der Zuckergärung dargetan worden war.

Um eine schnelle Reduktion beträchtlicher Aldehydmengen erzielen zu können, müssen wir selbstverständlich zunächst die reduzierenden Eigenschaften der Hefe besser kennen lernen. Derartige Untersuchungen könnten zugleich zur Aufklärung der primären Phase der Gärung beitragen.

Daß Acetaldehyd bei der Zuckergärung durch eine Spaltung der intermediär gebildeten Brenztraubensäure entsteht, wie es in meinem obigen Schema angegeben ist, erscheint als wohl möglich. Auch Neuberg²⁾ selbst setzt voraus, daß Brenztraubensäure ein Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung vorstellt. Sollte es tatsächlich der Fall sein, so würde gleichzeitig der Mechanismus der Kohlendioxydbildung bei der Zymasegärung aufgeklärt werden. Eine Bestätigung dieser Hypothese könnte allerdings nur durch den Nachweis der Bildung von Brenztraubensäure bei Zuckervergärung gegeben werden: bei Beurteilung der Beweiskraft gelungener Versuche, Brenztraubensäure unter geeigneten Verhältnissen zu Äthylalkohol zu vergären, ist der Einwand nicht von der Hand zu weisen, daß eine Reduktion des fertigen Acetaldehyds vorliegt, die ja auch bei Abwesenheit von Brenztraubensäure möglich ist.

¹⁾ S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, H. 1/2, Chemische Berichte, Bd. 45, S. 1289 (1912).

²⁾ Neuberg und Kerb, l. c.
