

## Über Alkoholgärung.

### III. Mitteilung.

#### Die Bedingungen der Bildung von Acetaldehyd bei der Gärung von Dauerhefe.

Von

S. Kostytschew.

(Der Redaktion zugegangen am 10. Dezember 1912.)

In der ersten Mitteilung<sup>1)</sup> habe ich dargetan, daß bei der Zuckervergärung durch Hefanol in Gegenwart geringer Mengen von Zinkchlorid ziemlich beträchtliche Mengen von Acetaldehyd entstehen. In der zweiten Mitteilung<sup>2)</sup> wurden Versuche beschrieben, welche die Möglichkeit einer Reduktion von Acetaldehyd zu Äthylalkohol sowohl durch lebende Hefe, als durch verschiedene Präparate von Dauerhefe beweisen. Auf Grund dieser Ergebnisse habe ich die Voraussetzung ausgesprochen, daß Acetaldehyd ein intermediäres Produkt der alkoholischen Gärung vorstellt: durch die Wirkung von  $\text{ZnCl}_2$  könnte nämlich der Acetaldehyd vor der weiteren Verarbeitung geschützt werden und also in großen Mengen auftreten (das Vorkommen sehr geringer Mengen von Acetaldehyd bei der Hefegärung ist ja eine schon längst bekannte Tatsache!) Da  $\text{ZnCl}_2$  außerordentlich starke polymerisierende Eigenschaften aufweist, so lag die Annahme nahe, daß die Anhäufung von Acetaldehyd auf Bildung von Paraldehyd bzw. Metaldehyd zurückzuführen ist.

In einer unlängst veröffentlichten Publikation berichteten C. Neuberg und J. Kerb<sup>3)</sup> über die Resultate einer Nachprüfung von meiner ersten Arbeit. Die von mir hervorgehobene

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 130 (1912).

<sup>2)</sup> S. Kostytschew und E. Hübbenet, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 359 (1912).

<sup>3)</sup> C. Neuberg und J. Kerb, Biochemische Zeitschrift, Bd. 43, S. 494 (1912).

spezifische Wirkung von Zinkchlorid haben die Verfasser bestätigt; sie sind jedoch mit meinen Voraussetzungen durchaus nicht einverstanden und erheben dagegen folgende Einwände:

1. Die von mir gegebene Erklärung der Wirkung von Zinkchlorid sei nicht zulässig, da Paraldehyd bei der Destillation seiner wässerigen Lösung in die monomere Form nicht übergeht.

2. Da Zinkchlorid auch bei Selbstgärung von Hefanol Aldehydbildung hervorruft, so soll Acetaldehyd nicht aus Zucker, sondern aus den Spaltungsprodukten von Eiweiß entstehen.

Außerdem weisen C. Neuberg und J. Kerb darauf hin, daß auch Äthylalkohol die Bildung von «Acetaldehyd liefernden Stoffen» begünstigt.

Durch diese Auseinandersetzungen sind aber, meiner Meinung nach, die Bedingungen der Aldehydbildung nicht richtig dargestellt, und ich bin also genötigt, auf diesen Gegenstand wieder einzugehen.

Zunächst will ich aber die prinzipiell weniger wichtige Frage nach der Rolle von Zinkchlorid berühren. Ich bin weit davon entfernt, die Wirkungsweise von  $ZnCl_2$  als aufgeklärt zu betrachten. Die Annahme einer Polymerisation habe ich nur deshalb gemacht, weil sie, mit Rücksicht auf die bekannten Eigenschaften von Zinkchlorid, als naheliegend und (entgegen der wiederholt betonten Meinung von Neuberg und Kerb) wohl zulässig erschien. Es ist gewiß richtig, daß eine Lösung von Paraldehyd in reinem Wasser bei der Destillation keine Spur von Acetaldehyd liefert; wird aber die Destillation in Gegenwart geringer Menge von Säuren ausgeführt, so findet eine Depolymerisation von Paraldehyd statt. Die Acidität von Hefeeiweiß oder von Zinkchlorid selbst dürfte bereits zu einer Regeneration von Acetaldehyd ausreichen; ich erinnere aber daran, daß in meinen Versuchen eine Bildung von Säuren wahrgenommen wurde. Auch das Destillat zeigte immer die saure Reaktion.

Folgende einfache Versuche sollen das Gesagte erläutern; das hierzu verwendete Präparat von Paraldehyd wurde mehrmals ausgefroren, und es war vollkommen rein.

## I.

A. 10 ccm einer 10%igen Lösung von Paraldehyd, welche nicht die geringste Spur der Reaktion von Rimini<sup>1)</sup> gab, wurden mit 140 ccm Wasser versetzt und davon 20 ccm unter Eiskühlung abdestilliert. Das erhaltene Destillat gibt nicht die geringste Spur der Reaktion von Rimini.

B. 10 ccm von derselben 10%igen Lösung von Paraldehyd wurden mit 140 ccm Wasser und 0,2 g Weinsäure versetzt und davon 20 ccm unter Eiskühlung abdestilliert. Bereits der charakteristische Geruch des Destillats läßt die Gegenwart von Acetaldehyd erkennen. Die Reaktion von Rimini fällt äußerst stark positiv aus.

## II.

A. 20 ccm von derselben 10%igen Lösung von Paraldehyd wurden mit 180 ccm Wasser versetzt und destilliert. Das Destillat (20 ccm) gibt nicht die geringste Spur der Reaktion von Rimini.

B. 20 ccm von derselben Lösung wurden mit 180 ccm Wasser und einigen Tropfen Ameisensäure versetzt und destilliert. Das Destillat (20 ccm) riecht nach Acetaldehyd und liefert eine äußerst starke Reaktion von Rimini.

Aus folgendem ist ersichtlich, mit welcher Leichtigkeit die Spaltung von Paraldehyd erfolgt.

## III.

10 ccm einer 10%igen Lösung von Paraldehyd, welche nicht die geringste Spur der Reaktion von Rimini gab, wurden mit 140 ccm Wasser versetzt. Mittels einer fein abgezogenen Pipette wurde nun ein kleiner Tropfen Ameisensäure zutropft und die Lösung destilliert. Das Destillat (20 ccm) riecht nach Acetaldehyd und liefert eine scharfe Reaktion von Rimini.

Durch diese Resultate wird selbstverständlich die Bildungsweise von Acetaldehyd nicht ganz aufgeklärt; bei der

---

<sup>1)</sup> Ich habe diese Probe mit verschiedenen aliphatischen und cyclischen Aldehyden ausgeführt und behaupte einstimmig mit Neuberg, daß sie streng beweisend für Acetaldehyd ist.

Besprechung der Wirkung von Methylenblau werde ich noch auf diese Frage zurückkommen.

Was nun den Ursprung von Acetaldehyd anbelangt, so haben Neuberg und Kerb gefunden, daß auch bei der Selbstgärung beträchtlicher Mengen von Hefanol in Gegenwart von  $ZnCl_2$  Acetaldehyd entsteht, und ziehen hieraus den Schluß, daß die Aldehydbildung mit dem eigentlichen Vorgange der alkoholischen Gärung nichts zu tun hat, sondern auf Kosten von Hefeeiweiß erfolgt.

In meinen früher veröffentlichten Versuchen kam ich dagegen zu dem Schluß, daß die Bildung von Acetaldehyd nur in Gegenwart von Zucker möglich ist. Der Widerspruch mit den Resultaten von Neuberg und Kerb ist aber nur ein scheinbarer. Die Selbstgärung ist ja nichts anderes, als die echte alkoholische Gärung, welche durch die Verzuckerung des vorrätigen Glykogens der Hefezellen in Gang gesetzt wird. In meinen Versuchen wurde die Gärung von je 3 g Hefanol in Gegenwart und bei Abwesenheit von Zucker untersucht. Nun ist der Stoffumsatz bei der Selbstgärung von 3 g Hefanol so gering, daß Acetaldehyd selbst durch empfindliche Reaktionen nicht nachgewiesen werden kann. Bei Anwendung größerer Hefemengen (wie es in Versuchen von Neuberg und Kerb der Fall war) kann jedoch die Glykogenvergärung zur Bildung einer nicht zu unterschätzenden Menge von Acetaldehyd führen. Selbstverständlich liefert aber die Zuckervergärung immer eine weit größere Aldehydausbeute. Bei der Selbstgärung von 100 g Hefanol erhielten z. B. Neuberg und Kerb 0,1 g rohes Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon, welches erst nach dem Umkrystallisieren (wobei Verluste unvermeidlich sind) bei  $127^\circ$  schmolz. Ich hatte dagegen bei der Gärung von 120 g Hefanol in Gegenwart von Zucker 0,5 g reines Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon erhalten. Ein direkter Vergleich dieser Zahlen ist allerdings kaum zulässig, da verschiedene Präparate von Dauerhefe sehr ungleiche Aldehydausbeuten liefern können; es müssen also vergleichende Untersuchungen mit einem und demselben Hefepräparat ausgeführt werden. In den Protokollen von Neuberg und Kerb sind

keine derartige Versuche zu finden; darum habe ich die Frage nach dem Einfluß von Zucker auf die Bildung von Acetaldehyd wieder einer eingehenden Untersuchung unterworfen. Die zahlreichen Versuche, welche immer bei Zimmertemperatur ausgeführt worden waren, ergaben vollkommen übereinstimmende Resultate. Bei Anwendung sehr geringer Hefemengen konnte ich bei der Selbstgärung keine Spur von Acetaldehyd auffinden, während die Destillate der gleichzeitig gegorenen Zuckerportionen scharfe Reaktionen auf Acetaldehyd lieferten. Größere Hefemengen bildeten durch Selbstgärung eine unbedeutende Menge von Acetaldehyd, welche aber nur einen kleinen Teil der bei Zuckergabe erhaltenen Aldehydausbeute vorstellte. Nachstehend sind die Resultate von einigen Versuchen wiedergegeben, in welchen die Ausbeuten an Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon durch direkte Wägung ermittelt wurden. Diese Versuche sind mit trockener Dauerhefe nach v. Lebedew<sup>1)</sup> ausgeführt.

## I.

A. Selbstgärung. 2 Gärkölbchen mit je 10 g Dauerhefe, 0,35 g  $ZnCl_2$ , 50 ccm Wasser und 6 Tropfen Toluol.

B. Zuckergärung. 2 Gärkölbchen mit je 10 g Dauerhefe, 10 g Rohrzucker, 0,35 g  $ZnCl_2$ , 50 ccm Wasser und 6 Tropfen Toluol.

Die Gärung dauerte 6 Tage bei Zimmertemperatur: alsdann wurde sowohl von A, als von B je 30 ccm abdestilliert und davon je 2 ccm für die Reaktion von Rimini verwendet.

A. Reaktion von Rimini schwach (violette Färbung). Nach Zusatz von p-Nitrophenylhydrazin in essigsaurer Lösung bildete sich ein geringer Niederschlag, der nach dem Trocknen 0,0074 g wog. Die Substanz war nicht rein; nach dem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol war die Menge von Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon selbst für eine Schmelzpunktbestimmung nicht ausreichend.

B. Reaktion von Rimini sehr stark (dunkelblaue Färbung). Nach Zusatz von p-Nitrophenylhydrazin in essigsaurer Lösung bildete sich ein voluminöser Niederschlag, der nach dem Trocknen

<sup>1)</sup> A. v. Lebedew, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 447 (1911).

0,0836 g wog und den Schmelzpunkt  $124^{\circ}$  zeigte. Nach dem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol wurde 0,0549 g Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon vom Schmelzpunkt  $127,5^{\circ}$  erhalten.

## II.

Wiederholung des vorstehenden Versuchs mit einem anderen Präparat von Dauerhefe.

A. Selbstgärung. 2 Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 0,35 g  $\text{ZnCl}_2$ , 50 ccm Wasser und 6 Tropfen Toluol.

B. Zuckergärung. 2 Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 10 g Rohrzucker, 0,35 g  $\text{ZnCl}_2$ , 50 ccm Wasser und 6 Tropfen Toluol.

Dauer der Gärung 5 Tage bei Zimmertemperatur. Das Destillat von A gab eine schwache Reaktion von Rimini (violette Färbung). Die Ausbeute an Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon betrug 0,0058 g; nach dem Umkrystallisieren war die Menge der Substanz äußerst gering.

Das Destillat von B gab eine starke Reaktion von Rimini (tiefblaue Färbung). Die Ausbeute an Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon betrug 0,0881 g. (Schmelzpunkt nach dem Umkrystallisieren  $127,5^{\circ}$ .)

Die Versuche zeigen, wie groß der Unterschied zwischen zuckerfreien und zuckerhaltigen Portionen in bezug auf die Aldehydbildung ist. Es liegt also die Annahme nahe, daß bei vollkommener Abwesenheit von Zucker keine merkliche Aldehydbildung stattfindet. Diese Annahme wird nun tatsächlich durch Versuche mit Macerationshefesaft bestätigt. A. v. Lebedew<sup>1)</sup> hat nämlich darauf hingewiesen, daß der nach seiner Methode dargestellte Macerationsssaft beinahe vollkommen zuckerfrei ist.

## III.

Der nach den Angaben von A. v. Lebedew dargestellte Macerationsssaft wurde in zwei gleiche Portionen A und B zu je 35 ccm geteilt. Eine jede Portion wurde mit 0,12 g  $\text{ZnCl}_2$  und 6 Tropfen Toluol versetzt. In die Portion B wurden außerdem 10 g Rohrzucker hineingetan. Beide Kolben wurden mit Meisslschem Gärverschluß versehen und 4 Tage bei Zimmer-

<sup>1)</sup> A. v. Lebedew, l. c.

temperatur stehen gelassen. Während dieser Zeit wurden folgende  $\text{CO}_2$ -Mengen gebildet.

$$\text{A. CO}_2 = 0,02 \text{ g}$$

$$\text{B. CO}_2 = 0,93 \text{ g.}$$

Von jeder Portion wurden 20 ccm abdestilliert. Das Destillat der Portion A gab nicht die Reaktion von Rimini. Nach Zusatz von p-Nitrophenylhydrazin in essigsaurer Lösung erfolgte keine Fällung.

Das Destillat der Portion B gab eine starke Reaktion von Rimini. Nach Zusatz von p-Nitrophenylhydrazin in essigsaurer Lösung bildete sich der charakteristische Niederschlag von Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon. Die Ausbeute betrug 0,0241 g. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol zeigte die Substanz den Schmelzpunkt  $127^\circ$ .

Durch diese Resultate will ich keineswegs die Möglichkeit einer Bildung von Acetaldehyd aus Aminosäuren in Abrede stellen; meine Versuche zeigen aber, daß diese Bildungsweise von Acetaldehyd bei obiger Versuchsanordnung gar nicht in Betracht kommt: nur bei Zymasegärung bewirkt Zinkchlorid eine Anhäufung von Acetaldehyd. Die Versuche von Neuberg und Kerb erlauben also nur den Schluß zu ziehen, daß, bei Anwendung beträchtlicher Hefemengen, der Acetaldehyd durch Vergärung von hydrolysiertem Glykogen entstehen kann. Dies habe ich auch bestätigt. Es besteht überhaupt kein sachlicher Widerspruch zwischen den vorstehend mitgeteilten Versuchen und den Ergebnissen von Neuberg und Kerb. Hoffentlich wird also auch Professor Neuberg zu denselben Schlußfolgerungen kommen wie ich, wenn er sich nur an meine Versuchsbedingungen hält und zwar ziemlich geringe Mengen von Dauerhefe (20—30 g) im Verlaufe von 6 Tagen bei Zimmertemperatur gären läßt. Diese Bedingungen haben nämlich den Zweck, die Bedeutung der Selbstgärung möglichst herabzusetzen.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Im Brutschrank wird die Glykogenverzuckerung und also die Selbstgärung bedeutend gesteigert; andererseits muß beim Vergleich der Selbstgärung mit der Zuckergärung im Brutschrank die Versuchsanordnung insofern modifiziert werden, als namentlich die Zuckerportion mit einer größeren  $\text{ZnCl}_2$ -Menge zu versetzen ist, als bei Zimmertemperatur. In

Was nun den Einfluß von Äthylalkohol auf die Bildung von Acetaldehyd anbelangt, so kann ich mich leider der Meinung von Neuberg und Kerb wiederum nicht anschließen. Die Verfasser behaupten, daß «Äthylalkohol wie Chlorzink die Bildung von Acetaldehyd liefernden Stoffen begünstigen». Die Versuchsergebnisse von Neuberg und Kerb berechtigen aber kaum zu einer derartigen Schlußfolgerung: aus den Versuchsprotokollen ist zwar ersichtlich, daß die Selbstgärung beträchtlicher Mengen von Hefanol in 5%igem Alkohol mit einer Bildung von Acetaldehyd zusammenhängt, doch fällt es gleich auf, daß sämtliche Versuchskolben nicht nur mit Alkohol, sondern auch mit Zinkchlorid versetzt wurden. Bei Wiederholung dieser Versuche habe ich jedoch gefunden, daß Äthylalkohol an und für sich keine Anhäufung von Acetaldehyd hervorruft. Bei der kombinierten Wirkung von Zinkchlorid und aldehydfreiem Alkohol ist die Aldehydreaktion der Destillate etwas schärfer, als bei Anwendung von Zinkchlorid allein. Diese Beobachtung wäre als ein Argument zugunsten der intermediären Bildung von Acetaldehyd bei der Gärung anzusehen, falls sie durch quantitative Bestimmungen bestätigt werden könnte.<sup>1)</sup> Es ergab sich jedoch, daß die Ausbeuten an Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon in beiden Fällen die gleichen sind und bleiben also hinter der bei Zuckergärung erhaltenen Ausbeute bedeutend zurück. Folgender Versuch wird das Gesagte erläutern.

Portion A. Zwei Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 50 ccm Wasser, 5 g Äthylalkohol und 6 Tropfen Toluol.

Portion B. Zwei Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 50 ccm Wasser, 5 g Äthylalkohol, 0,3 g  $ZnCl_2$  und 6 Tropfen Toluol.

Portion C. Zwei Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 50 ccm Wasser, 0,3 g  $ZnCl_2$  und 6 Tropfen Toluol.

einem derartigen Versuche hatte ich sogar bei gleichen  $ZnCl_2$ -Zusätzen eine viel größere Aldehydbildung bei Zimmertemperatur wahrgenommen. Späterhin ergab es sich, daß die stürmische Gärung eine entsprechend größere  $ZnCl_2$ -Menge erfordert.

<sup>1)</sup> Bei den fermentativen Reaktionen wird bekanntlich durch große Mengen von Endprodukten die Reaktionsgeschwindigkeit vermindert und hierdurch eine Anhäufung von intermediären Produkten ermöglicht.



Portion D. Zwei Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 50 ccm Wasser, 10 g Rohrzucker, 0,3 g  $ZnCl_2$  und 6 Tropfen Toluol.

Dauer der Gärung 4 Tage bei Zimmertemperatur. Von einer jeden Portion wurden 20 ccm abdestilliert und davon je 2 ccm für die Reaktion von Rimini verwendet.

A. Nur eine schwache Andeutung auf Acetaldehydreaktion: das Destillat wurde also nicht weiter verarbeitet.

B. Schwache Reaktion (hellblaue Färbung).

C. Schwache Reaktion (violette Färbung).

D. Starke Reaktion (tiefblaue Färbung).

Die Destillate von B, C und D wurden mit den gleichen Mengen von Natriumbisulfit versetzt, nach einigem Stehen neutral gemacht und von Alkohol durch Destillation befreit. Alsdann wurden die Bisulfitverbindungen zerlegt, der Acetaldehyd abdestilliert und als p-Nitrophenylhydrazon abgeschieden. Es wurden folgende Ausbeuten erhalten.

Portion B. 0,0169 g (Schmelzpunkt nach dem Umkristallisieren  $127,5^\circ$ ).

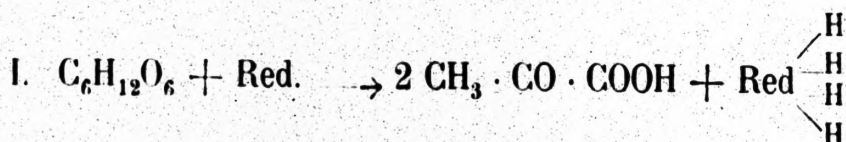
Portion C. 0,0167 g (Schmelzpunkt nach dem Umkristallisieren  $127^\circ$ ).

Portion D. 0,0607 g (Schmelzpunkt nach dem Umkristallisieren  $128^\circ$ ).

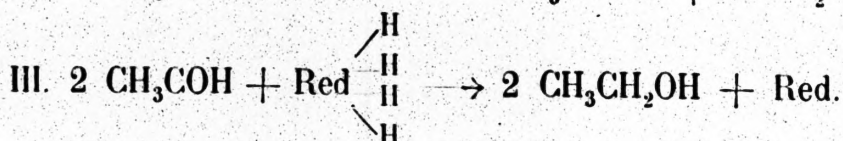
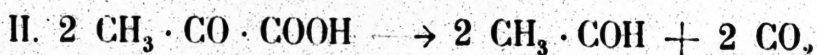
Versetzt man Zuckerportionen außer  $ZnCl_2$  mit Äthylalkohol, so wird hierdurch die Aldehydausbeute sogar herabgesetzt, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß auch die primäre Zuckerspaltung durch eine beträchtliche Menge von Alkohol gehemmt wird. Es liegt allerdings nur ein einziger Versuch dieser Art vor; möglicherweise ist das Resultat von dem Verhältnis der Mengen von Zinkchlorid und Alkohol abhängig.

Es ist mir also nicht gelungen, durch Zusatz von Alkohol eine Bildung von Acetaldehyd hervorzurufen; die Rolle von Acetaldehyd bei der Zymasegärung kann aber auf eine andere Weise illustriert werden. Nach meinem bereits früher veröffentlichten Schema<sup>1)</sup> sind Reduktasen an der alkoholischen Gärung auf folgende Weise beteiligt.

<sup>1)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 143 (1912).



Dieser Vorgang ist selbstverständlich eine komplizierte, aus mehreren Phasen bestehende Reaktion. Folgende Schlußphasen sind aber als einfache Reaktionen zu betrachten.



Durch die in der zweiten Mitteilung beschriebenen Versuche wurde dargetan, daß eine Reduktion von Acetaldehyd zu Äthylalkohol durch lebende und getötete Hefe möglich ist. Die Richtigkeit von meinem Schema kann auf folgende Weise geprüft werden. Wird der aktive (an Reduktase gebundene) Wasserstoff durch einen leicht reduzierbaren Körper weggenommen, so muß hierdurch offenbar eine Bildung von Acetaldehyd hervorgerufen werden. Dies ist nun tatsächlich der Fall, wenn die Gärung von Dauerhefe in Gegenwart von Methylenblau stattfindet. Die Menge von Methylenblau muß selbstverständlich so berechnet werden, daß die Flüssigkeit bis zum Ende der Gärung intensiv gefärbt bleibt.

### I.

Kolben A. 5 g Dauerhefe, 25 ccm Wasser, 5 g Rohrzucker.

Kolben B. 5 g Dauerhefe, 25 ccm Wasser, 5 g Rohrzucker und 0,25 g Methylenblau (nach P. Ehrlich). Ein jeder Kolben wurde mit 6 Tropfen Toluol versetzt.

Nach zwei Tagen hat sich die Flüssigkeit in B beinahe entfärbt: die Gegenwart von Acetaldehyd läßt sich bereits durch den charakteristischen Geruch erkennen. Der Kolben B wurde wiederum mit 0,25 g Methylenblau versetzt. Gesamtdauer der Gärung 4 Tage.

Das Destillat von A gab eine schwache Andeutung auf die Reaktion von Rimini. Mit einem empfindlichen Präparat von fuchsinschwelliger Säure versetzt, zeigte das Destillat

schwache Rosafärbung. Das Destillat von B gab eine äußerst starke Reaktion von Rimini. Mit fuchsinschweflicher Säure tiefrote Färbung.

## II.

Portion A. Zwei Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 50 ccm Wasser, 10 g Rohrzucker und 6 Tropfen Toluol.

Portion B. Zwei Kolben mit je 10 g Dauerhefe, 50 ccm Wasser, 10 g Rohrzucker, 0,5 g Methylenblau nach P. Ehrlich und 6 Tropfen Toluol.

Nach zwei Tagen wurden die Kolben der Portion B wiederum mit je 0,5 g Methylenblau versetzt. Dauer der Gärung 5 Tage.

Das Destillat der Portion A gab eine sehr schwache Reaktion von Rimini. Nach Zusatz von p-Nitrophenylhydrazin in essigsaurer Lösung bildete sich kein Niederschlag.

Das Destillat der Portion B gab eine starke Reaktion von Rimini. Nach Zusatz von p-Nitrophenylhydrazin bildete sich sofort das charakteristische Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon. Die Ausbeute betrug 0,0946 g. Schmelzpunkt (nach dem Umkrystallisieren aus 32 % igem Alkohol) 128°. Der Schmelzpunkt veränderte sich nicht nach dem Vermischen mit einem reinen Präparat von Acetaldehyd-p-nitrophenylhydrazon.

Der gesamte Vorgang der alkoholischen Gärung scheint durch Methylenblau bedeutend weniger verändert zu sein als durch Zinkchlorid (davon wird in folgenden Mitteilungen die Rede sein). Auch ist die spezifische Wirkung von Methylenblau und der Zusammenhang dieser Wirkung mit dem Entstehen von Acetaldehyd begreiflicher, als die spezifische Wirkung von Zinkchlorid: Methylenblau wirkt wahrscheinlich nur durch seine Affinität zum Wasserstoff. Um so beachtenswerter ist der Umstand, daß beide verschiedenartige Wirkungen zur Bildung von einem und demselben Produkt, namentlich Acetaldehyd, führen. Aus diesem Grunde bleibe ich bei meiner Arbeitshypothese, die außerdem eine Veranlassung zu anderweitigen noch nicht beendigten Untersuchungen gegeben hat.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Folgende, allerdings von vornherein wenig wahrscheinliche Voraussetzung ist durch die in der vorliegenden Mitteilung beschriebenen Ver-

Während in meinen Versuchen die antiseptische Wirkung von Toluol ganz tadellos war, haben Neuberg und Kerb in einigen Versuchen die Entwicklung von Mikroorganismen wahrgenommen. Gerade in unserem Falle ist dieser Umstand von geringer Bedeutung, da er jedoch bei anderweitigen Untersuchungen eine hervorragende Rolle spielen kann, so will ich diese Gelegenheit zu einer Besprechung der Wirkungsweise von Toluol benutzen. Da Toluol eine starke Vergiftung von lebendem Plasma hervorruft, aber die Wirkung der Fermente nur wenig beeinträchtigt, so wird dieses Antiseptikum bei den Untersuchungen über Fermente mit Vorliebe verwendet. Es muß aber darauf aufmerksam gemacht werden, daß Toluol in Wasser sehr schwer löslich ist; infolgedessen erstreckt sich seine Wirkung nur auf eine geringe Entfernung von der Oberfläche der Flüssigkeit. Nimmt man also ein großes Volumen der Flüssigkeit für den Versuch, so ist die antiseptische Wirkung von Toluol am Boden gleich Null. Dieser Sachverhalt kann nicht durch Anwendung größerer Toluolmenge verändert werden: hierbei wird nur die an der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmende Menge von Antiseptikum unnötigerweise vermehrt. Wenn man jedoch die Versuchsflüssigkeit auf mehrere Kolben mit großer Bodenoberfläche verteilt, so sind hierdurch günstige Bedingungen für die Toluolwirkung geschaffen, und es ist dann durchaus nicht nötig, beträchtliche Mengen von Antiseptikum zu verwenden; man hat nur der großen Flüchtigkeit von Toluol Rechnung zu tragen, zumal bei Gasdurchleitung.

suche nicht widerlegt: obschon die Bildung von Acetaldehyd nur bei Zymasegärung stattfindet, könnte sie von der Zuckerspaltung nur in der Weise abhängig sein, daß die frei gewordene Energie der Zuckergärung zur Aldehydbildung verwendet würde, ebenso wie bei der von F. Ehrlich untersuchten Fuselölgärung. Ein derartiger energetischer Zusammenhang von Reaktionen, welcher in lebenden Zellen nicht stattfindet, könnte jedoch nur durch einen äußerst unwahrscheinlichen Zufall außerhalb der Zelle zur Geltung kommen. Außerdem wird die soeben erwähnte Annahme durch meine weiteren noch nicht publizierten Untersuchungen über den Zuckerzerfall in Gegenwart von  $ZnCl_2$  entkräftet.