

Über Alkoholgärung.

VI. Mitteilung.

Das Wesen der Reduktion von Acetaldehyd durch lebende Hefe.

Von

S. Kostytschew.

(Aus dem bötanischen Laboratorium des technologischen Instituts in St. Petersburg.)
(Der Redaktion zugegangen am 4. Februar 1914.)

In der II. Mitteilung wurde dargetan, daß sowohl lebende als getötete Hefe eine Bildung von Äthylalkohol aus Acetaldehyd bewirkt. Auf diese Weise wurde mehr als 1 g absoluter Alkohol vom richtigen Siedepunkt $78,5^{\circ}$ gewonnen.¹⁾ Damals habe ich die Voraussetzung ausgesprochen, daß hier eine Reduktion von Acetaldehyd durch den bei der Gärung entstehenden aktiven Wasserstoff vorliegt; die weitere Untersuchung ergab jedoch, daß der Acetaldehyd durch lebende Hefe auf eine andere Weise verarbeitet wird. Neben Äthylalkohol entsteht immer Essigsäure, wie es z. B. aus folgendem Versuche zu ersehen ist.

Portion A. 125 g Preßhefe wurde mit 1,5 l Wasser versetzt und 48 Stunden ruhig stehen gelassen (Kontrollportion I).

Portion B. 125 g Preßhefe wurde mit 1,5 l Wasser 15 Minuten am Rückflußkühler gekocht, dann abgekühlt, mit 2 g von frisch dargestelltem und dreimal mit Dephlegmator destillierten Acetaldehyd (Siedepunkt $21-21,5^{\circ}$) versetzt und 6 Tage bei reichlichem Luftzutritt belassen (Kontrollportion II).

Portion C. 125 g Preßhefe wurde mit 1,5 l Wasser und 2 g reinem Acetaldehyd (wie bei B) versetzt und 48 Stunden ruhig stehen gelassen.

¹⁾ S. Kostytschew und E. Hübbenet, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 359 (1912).

Von je einer Portion wurden 1200 ccm für die Darstellung der flüchtigen Säuren verwendet. Sämtliche Portionen wurden mit Natronlauge neutral gemacht, eingedampft, mit je 7 g Weinsäure versetzt und unter Wasserdampfdurchleitung destilliert. Die Destillate erforderten zur Neutralisation folgende Mengen von $\frac{1}{2}$ -n-Natronlauge:

A — 4,6 ccm, B — 6,8 ccm, C — 20,6 ccm. A stellt die Menge der flüchtigen Säuren vor, die in der Preßhefe bereits enthalten (die Preßhefe enthält immer Alkohol und Säuren) und bei der Selbstgärung gebildet war. B stellt die Menge der flüchtigen Säuren vor, die in der Preßhefe enthalten und durch 6tägige Autoxydation von Acetaldehyd gebildet war. Die neutral gemachten Destillate von A und C wurden mit Chromsäuremischung (400 g Schwefelsäure und 90 g Kaliumbichromat im Liter) versetzt, 20 Minuten am Rückflußkühler gekocht, um die Ameisensäure zu zersetzen,¹⁾ dann wiederum unter Wasserdampfdurchleitung destilliert. Jetzt wurden die Destillate durch folgende Mengen von $\frac{1}{2}$ -n-Natronlauge neutral gemacht: A — 3,7 ccm; C — 19,7 ccm. Nach der Neutralisation wurden die Destillate eingedampft und auf Ameisensäure geprüft. Die empfindlichen Ameisensäurereaktionen (Silberabscheidung beim Erhitzen mit Silbernitrat und Kalomelabscheidung beim Erhitzen mit Sublimat) fielen negativ aus. Die Oxydation der Ameisensäure war also eine vollkommene. Die Gesamtmenge der nach Zerstörung der Ameisensäure gefundenen flüchtigen Säuren kann praktisch als Essigsäure berechnet werden; andere Säuren werden in nennenswerten Mengen nicht gebildet, wie aus folgendem zu ersehen ist. Das eingedampfte Destillat von C wurde mit Silbernitrat gefällt und das Silbersalz für die Silberbestimmung verwendet.

0,3383 g Substanz gaben 0,2188 g Ag.

Berechnet für Silberacetat: Ag = 64,64 %.

Gefunden: Ag = 64,68 %.

Nach Abzug der in Kontrollportion gefundenen Säuremenge ist also die Menge der aus Acetaldehyd gebildeten Essigsäure

¹⁾ K. Windisch, Zeitschr. f. Unters. der Nahr.- und Genußmittel, Bd. 8, S. 470 (1904).

gleich 0,480 g¹⁾ oder 0,600 g auf die gesamte Portion C. Folgender Versuch zeigt, daß ungefähr dieselbe Menge von Essigsäure auch bei Luftabschluß entsteht.

Portion A. 125 g Preßhefe und 1,5 l ausgekochtes Wasser.

Portion B. 125 g Preßhefe wurde mit 1,5 l Wasser gekocht, dann abgekühlt und mit 2 g frisch dargestelltem reinem (Siedepunkt 21—21,5°) Acetaldehyd versetzt.

Portion C. 125 g Preßhefe wurde mit 1,5 l ausgekochtem Wasser und 2 g reinem Acetaldehyd versetzt.

Sämtliche Portionen wurden mit flüssigem Paraffinöl überschichtet und für 24 Stunden stehen gelassen. Von je einer Portion wurden 1200 ccm mit Natronlauge neutral gemacht, eingedampft, mit Weinsäure versetzt und unter Wasserdampfdurchleitung destilliert. Das Destillat von B enthielt eine ganz geringe Säuremenge. Die Destillate von A und C wurden durch folgende Mengen $\frac{1}{2}$ -n-Natronlauge neutral gemacht: A = 4,6 ccm, C = 22,2 ccm. Nach Zerstörung der etwa vorhandenen Ameisensäure waren die entsprechenden Werte: 4,5 ccm und 22,1 ccm. Das neutral gemachte Destillat von C wurde eingedampft und für die Darstellung von Silbersalz verwendet. Die Silberbestimmung ergab folgendes Resultat.

0,2505 g Substanz gaben 0,1617 g Ag.

Berechnet für Silberacetat: Ag = 64,64 %.

Gefunden: Ag = 64,55 %.

Die Menge der gebildeten Essigsäure ist gleich 0,528 g. Im ganzen hat die Portion C 0,660 g Essigsäure gebildet.

Weiterhin ergab es sich, daß bei der Verarbeitung von Acetaldehyd äquimolekulare Mengen von Äthylalkohol und Essigsäure entstehen.

Portion A. 150 g Preßhefe und 1,5 Liter ausgekochtes Wasser.

¹⁾ Bei der Wasserdampfdestillation könnte eine geringe Menge der etwa gebildeten Milchsäure in die Vorlage übergehen und dann durch Chromsäuremischung zu CO₂ und Essigsäure oxydiert werden. Da aber kein Grund vorliegt, anzunehmen, daß in dieser Beziehung Differenzen zwischen Kontroll- und Versuchsportion zustande kommen, so kann das Endresultat hierdurch kaum beeinträchtigt werden.

Portion B. 150 g Preßhefe, 1,5 Liter ausgekochtes Wasser und 2 g von frisch dargestelltem und dreimal mit Dephlegmator destilliertem Acetaldehyd (Siedepunkt 21—21,5°).

Beide Portionen wurden 24 Stunden stehen gelassen, dann wurde von je einer Portion 1 Liter genommen, mit Natronlauge neutral gemacht und davon je 360 ccm abdestilliert. Das Destillat von A gab nicht die Aldehydreaktionen und wurde also direkt für die Alkoholbestimmung nach Nicloux¹⁾ verwendet. Das Destillat von B gab starke Aldehydreaktionen. 100 ccm des Destillats wurden mit NaHSO₃ destilliert, dann mit Natronlauge rektifiziert und das letzte Destillat auf 100 ccm aufgefüllt.²⁾ Die Alkoholbestimmungen ergaben folgende Resultate:

A. 25 ccm Destillat wurde mit 25 ccm Wasser versetzt. 5 ccm der Mischung verbrauchten 1,6 ccm K₂Cr₂O₇.

$$\text{Alkohol} = 1,6 \cdot 0,360 \cdot 0,7938 \cdot 2 = 0,915 \text{ g.}$$

$$\text{Gesamtmenge von Alkohol der Portion A} = 0,915 \cdot 1,5 = 1,372 \text{ g.}$$

B. 25 ccm Destillat wurde mit 50 ccm Wasser versetzt. 5 ccm der Mischung verbrauchten 1,5 ccm K₂Cr₂O₇.

$$\text{Alkohol} = 1,5 \cdot 0,360 \cdot 0,7938 \cdot 3 = 1,286 \text{ g.}$$

$$\text{Gesamtmenge von Alkohol der Portion B} = 1,286 \cdot 1,5 = 1,929 \text{ g.}$$

¹⁾ Nicloux, *Bullet. soc. chim.*, Bd. 35, S. 330 (1906).

²⁾ In einer unlängst veröffentlichten Mitteilung, die mir leider nur während Abfassung dieser Schrift bekannt geworden ist, machen C. Neuberg und J. Kerb (*Biochem. Zeitschr.*, Bd. 58, S. 158; 11. Dez. 1913) Einwände gegen diese Methode der Aldehydabscheidung und behaupten außerdem, daß die Alkoholbestimmung nach Nicloux auch in Gegenwart von Acetaldehyd richtige Resultate liefert. Bei der Oxydation des Alkohols nach Nicloux werden in der Tat bereits geringe Mengen von Aldehyd gebildet, welche die Bestimmung nicht stören; in Gegenwart größerer Aldehydmengen wird jedoch die Nicloux'sche Methode meinen Erfahrungen nach nicht zuverlässig. Was nun die Abscheidung von Acetaldehyd in Form von Bisulfitverbindung anbelangt, so ist sie auf Grund einer soeben unternommenen Nachprüfung dem Verfahren von Neuberg vorzuziehen. Darüber werde ich gesondert mitteilen, jetzt will ich nur darauf hinweisen, daß ich meine Methode etwas modifiziert habe: nach Zusatz von Bisulfit destilliere ich im Vakuum unter schwacher Erwärmung nebst Kühlung der Vorlage.

Die Mehrproduktion der Portion B beträgt also **0,557 g.**

Die Rückstände von der Alkoholdestillation wurden mit Weinsäure versetzt und unter Wasserdampfdurchleitung destilliert. Das Destillat von A erforderte zur Neutralisation 4,8 ccm, das Destillat von B 21,0 ccm $\frac{1}{2}$ -n-Natronlauge; nach dem Kochen mit Chromsäuremischung und nachfolgender Destillation sind diese Zahlen unverändert geblieben. Das Destillat von B wurde eingeeengt und für die Darstellung von Silber-salz verwendet. Die Silberbestimmung ergab folgendes Resultat.

0,1443 g Substanz gaben 0,0932 g Ag.

Berechnet für Silberacetat: Ag = 64,64%

Gefunden: Ag = 64,54%

Es wurden also folgende Mengen von Essigsäure gebildet.

A 0,144 g: im ganzen 0,216 g

B 0,630 » » » 0,945 »

Die Mehrproduktion der Portion B beträgt **0,729 g.**

Es ergab sich also, daß die mit Acetaldehyd versetzte Portion auf 0,557 g Alkohol 0,729 g Essigsäure erzeugt hat. Das Verhältnis Alkohol : Essigsäure ist gleich 46 : 60,2, das Molekulargewicht von Äthylalkohol ist aber gleich 46; dasjenige von Essigsäure ist gleich 60.

Der Acetaldehyd wird also durch die sogenannte Cannizzarische Reaktion verarbeitet;



Die Cannizzarische Reaktion wird bei aromatischen Aldehyden bekanntlich durch Einwirkung von Alkalien, bei aliphatischen Aldehyden durch Aluminiumalkoholat, Magnesiumalkoholat und ähnliche Faktoren hervorgerufen. Nach den eingehenden Untersuchungen von Tistschenko¹⁾ ist als Zwischenstufe der Cannizzarischen Reaktion die Esterbildung aus zwei Aldehydmolekülen anzusehen; diese wichtigste Phase, bei der namentlich die Umlagerung des Wasserstoffatoms erfolgt, kann, den Untersuchungen von Tist-

¹⁾ Tistschenko, Über die Einwirkung der Aluminiumalkoholate auf Aldehyde (1906), russisch.

schenko nach, bei vollkommener Abwesenheit von Wasser stattfinden.



Ich habe zuerst auf die Möglichkeit der Anteilnahme der Cannizzaroschen Reaktion am Gärungsvorgange hingewiesen;¹⁾ in der letzten Mitteilung von C. Neuberg und J. Kerb²⁾ wird bereits ein Gärungsschema unter Mitwirkung der Cannizzaroschen Reaktion angegeben; die genannten Forscher haben ihre ursprüngliche Vorstellung von dem Mechanismus der Gärung verändert und behaupten jetzt, ebenso wie ich, daß Acetaldehyd ein intermediäres Gärungsprodukt vorstellt. Ist dies tatsächlich der Fall, so wird der Acetaldehyd im eigentlichen Gärungsvorgange freilich nicht auf dieselbe Weise verarbeitet, wie in den vorstehend beschriebenen Versuchen. Auch kann ich mich der Meinung von Neuberg und Kerb (l. c.), welche die Cannizzarosche Reaktion zwischen Acetaldehyd und Methylglyoxal annehmen, so lange experimentelle Beweise dafür fehlen, aus verschiedenen Gründen nicht anschließen. Andererseits ist es wohl möglich, daß die Übertragung der Wasserstoffatome, die ich in mein Schema eingeschlossen hatte,³⁾ auf einer früheren Stufe der Gärung stattfindet. Es erscheint als kaum ratsam, diesen Vorgang vollkommen auszuschließen, mit Rücksicht auf die Bildung von Schwefelwasserstoff aus Schwefel⁴⁾ und andere durch die Cannizzarosche Reaktion nicht erklärbaren Reduktionswirkungen der Hefe.

In einer alsbald zu erscheinenden Mitteilung komme ich auf diese Fragen zurück. In dieser Publikation werden auch die Resultate der mit Dauerhefe ausgeführten Versuche veröffentlicht werden.

¹⁾ S. Kostytschew, Chemische Berichte, Bd. 45, S. 1289 (1912).

²⁾ C. Neuberg und J. Kerb, l. c.

³⁾ S. Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 79, S. 130 und 359 (1912).

⁴⁾ Chowrenko, Diese Zeitschrift, Bd. 80, S. 253 (1912); J. Rey-Pailhade, Bull. soc. chim., Bd. 23, S. 666 (1900); Pozzi-Eskot, Etat actuel de nos connaissances sur les oxydases et les réductases. Paris 1902.