

## Über Alkoholgärung.

Von

**S. Kostytschew.**

### IX. Mitteilung.

#### Die Einwirkung von Kadmium- und Zinksalzen auf Hefefermente.

Von

**S. Kostytschew und S. Subkowa.**

---

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität St. Petersburg.)  
(Der Redaktion zugegangen am 28. August 1920.)

---

In früher veröffentlichten Mitteilungen wurde dargetan, daß Chlorzink eine eigentümliche Wirkung auf die Zuckervergärung durch Dauerhefe ausübt. Hierbei wird erstens Acetaldehyd angehäuft, zweitens aber eine bedeutende Zuckermenge nicht in übliche Gärungsprodukte, sondern in andere unbekannte Stoffe verwandelt.

Beachtenswert scheint uns der Umstand zu sein, daß die Zinkwirkung eine ganz spezifische ist. In noch nicht publizierten Versuchen hat der eine von uns (S. K.) sich vergewissert, daß nicht nur Chlorzink, sondern auch andere Zinksalze eine und dieselbe Wirkung auf die alkoholische Gärung ausüben, indes andere Metalle, namentlich Strontium, Zinn, Aluminium, Quecksilber, Kalzium und Magnesium keine, oder nur ganz geringe Aldehydbildung hervorrufen.

Nun haben wir gefunden, daß Kadmiumsalze dieselben Vorgänge wie Zinksalze bewirken, nur ist die Kadmiumwirkung erheblich stärker als die Zinkwirkung. Folgende Versuche mögen dies illustrieren.

Nr. 1. 10 g Hefanol, 10 g Traubenzucker und 50 ccm einer 0,02 n. Lösung von  $\text{CdBr}_2$ . Versuchsdauer 4 Tage. Antiseptikum Toluol.

$\text{CO}_2$ , 0,16 g; Alkohol 0,113 g; Acetaldehyd 38 mg.  
Alkohol : Acetaldehyd 3 : 1.

Nr. 2. Wiederholung des vorstehenden Versuches.

$\text{CO}_2$ , 0,17 g; Alkohol 0,111 g; Acetaldehyd 34 mg.  
Alkohol : Acetaldehyd 3 : 1.

In Gegenwart von Kadmiumsalsz beträgt also die Aldehyd- ausbeute ein Drittel der Alkoholausbeute. Die Mengen der entstandenenen normalen Produkte sind sehr gering, doch nicht entsprechend gering ist der Zuckerverbrauch, wie aus folgendem Versuche zu ersehen ist<sup>1)</sup>.

Nr. 3. 10 g Hefanol in 50 ccm 0,02 n. Lösung von  $\text{CdBr}_2$  mit Zucker. Versuchsdauer 3 Tage. Antiseptikum Toluol.

$\text{CO}_2$ , 0,16 g; Acetaldehyd 31 mg.  
Invertzucker vor dem Versuche . . . . . 10,52 g,  
" nach " . . . . . 8,62 g,  
Zuckerverbrauch 1,84 g.

Nr. 4. Wiederholung des vorstehenden Versuches.

$\text{CO}_2$ , 0,20 g; Acetaldehyd 28 mg.  
Invertzucker vor dem Versuche . . . . . 10,52 g,  
" nach " . . . . . 8,05 g,  
Zuckerverbrauch 2,47 g.

Die Zuckerverarbeitung wird also durch  $\text{CdBr}_2$  nicht so stark gehemmt, wie es auf den ersten Blick erscheinen könnte. Zucker wird grammweise verbraucht, indes  $\text{CO}_2$ , Alkohol und Aldehyd nur in ganz geringen Mengen auftreten. Bei der Beurteilung der Wirkung von Zink- und Kadmiumsalsz auf die Zuckervergärung durch Hefanol und Trockenhefe muß man den soeben erörterten Umstand stets im Auge behalten.

<sup>1)</sup> Die Zuckerbestimmungen wurden nach der Methode von G. Bertrand (Bullet. de la soc. chimique Bd. 35, S. 1285 [1906]) ausgeführt; in betreff der  $\text{CO}_2$ -, Alkohol- und Acetaldehydbestimmungen vgl. vorstehende VIII. Mitteilung.

Weiterhin haben wir untersucht, welche Hefefermente durch Kadmiumsalze direkt beeinflußt werden. Folgender Versuch zeigt, daß die Eiweißhydrolyse in Trockenhefe sowohl in Gegenwart als in Abwesenheit von Kadmiums Salzen im gleichen Tempo verläuft.

Nr. 5. Zwei Portionen zu je 2 g Trockenhefe nach v. Lebedew. Portion A wurde mit 10 ccm 0,33%iger Essigsäure, Portion B mit einer 0,02 n. Lösung von  $\text{CdBr}_2$  in 0,33%iger Essigsäure versetzt. „Proteinstickstoff“ nach Stutzer in 2 g Trockenhefe = 163,8 mg. Versuchsdauer 3 Tage bei 35°. Antiseptikum Toluol.

Portion A.

„Protein-N“ vor dem Versuche . . . .	163,8 mg,
„ nach „ „ . . . .	20,0 mg.

Portion B.

„Protein-N“ vor dem Versuche . . . .	163,8 mg,
„ nach „ „ . . . .	29,0 mg.

Die Wirkung des proteolytischen Fermentes wird also durch Kadmiums Salze so gut wie gar nicht gehemmt. Auch wäre auf Grund dieser Ergebnisse die Voraussetzung nicht haltbar, daß der verschwundene Zucker in die von S. Kostytschew und W. Brilliant<sup>1)</sup> beschriebenen stickstoffhaltigen, nach Stutzer fällbaren Produkte übergeht. Durch ausführliche Versuche, die wir in einer anderen Mitteilung zu beschreiben beabsichtigen, haben wir festgestellt, daß in Gegenwart von Kadmiums Salzen keine mit verdünnter Salzsäure hydrolysierbaren Polysaccharide entstehen.

Ganz anders verhält sich die Hefereduktase: Methylblau wird in Gegenwart einer ganz geringen Menge von  $\text{CdBr}_2$  nicht entfärbt.

Nr. 6. Portion A: 1 g Trockenhefe, 0,02 g Methylblau (reinstes Präparat) und 0,0001 Mol.  $\text{CdBr}_2$  in neutraler Lösung bei Sauerstoffabschluß. Nach 24 Stunden gar keine Veränderung der Farbe im Vergleich zu der Kontrollportion (ohne Hefe).

<sup>1)</sup> S. Kostytschew und W. Brilliant, Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 372 (1914).

Portion B: 1 g Trockenhefe und 0,02 g Methylenblau bei denselben Verhältnissen, aber ohne  $\text{CdBr}_2$ . Nach 24 Stunden vollkommene Entfärbung der Lösung. Derartige Versuche haben wir öfters, und zwar immer mit einem und demselben Resultate ausgeführt.

Noch interessanter ist die Einwirkung von Kadmiumsalzen auf die Reduktion von Acetaldehyd durch Hefe. S. Kostytschew und E. Hübbenet<sup>1)</sup> haben dargetan, daß Hefe Acetaldehyd in Äthylalkohol verwandelt. Lebende Hefe bedient sich dabei der Cannizzaroschen Reaktion<sup>2)</sup>, Trockenhefe reduziert aber bedeutende Aldehydmengen ohne gleichzeitige Bildung von Essigsäure. Nun ergab es sich, daß Trockenhefe in Gegenwart von Kadmiumsalzen gar keine Aldehydreduktion bewirkt. Dies ist z. B. aus folgendem Versuche zu ersehen.

Nr. 7. Portion A: 20 g Trockenhefe und 490 mg Acetaldehyd (Siedep.  $21^\circ$ ) in 100 ccm Wasser.

Portion B: 20 g Trockenhefe und 490 mg Acetaldehyd (Siedep.  $21^\circ$ ) in 100 ccm 0,02 n. Lösung von  $\text{CdBr}_2$ .

Versuchsdauer 24 Stunden. Antiseptikum Toluol. Nach Beendigung des Versuches wurden Alkohol und Essigsäure bestimmt. Bezüglich der Methodik vgl. VI. Mitteilung<sup>3)</sup>.

#### Portion A.

Ohne  $\text{CdBr}_2$ . Alkohol 317,2 mg; Essigsäure 298 mg.

#### Portion B.

Mit  $\text{CdBr}_2$ . Alkohol Spur (14 mg); Essigsäure 54,7 mg.

Die mit  $\text{CdBr}_2$  versetzte Portion enthielt eine bedeutende Menge von unverändertem Acetaldehyd (301 mg). Die unbedeutende Menge von Essigsäure ist vielleicht, ebenso wie es in früher ausgeführten Versuchen über Aldehydreduktion der Fall war, durch Autoxydation des Aldehyds entstanden, da der Versuch bei Luftzutritt ausgeführt war. Äthylalkohol

<sup>1)</sup> S. Kostytschew und Hübbenet, Diese Zeitschr. Bd. 79, S. 359 (1912); Bd. 85, S. 408 (1913.)

<sup>2)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschr. Bd. 89, S. 367 (1914).

wurde aus Acetaldehyd in Gegenwart von  $\text{CdBr}_2$  nicht gebildet.

Die Tatsache, daß Reduktasewirkung durch Kadmiumsalze so stark gehemmt wird, ist höchst auffallend; ist doch Reduktase den am meisten stabilen Fermenten der Hefe beizuzählen; bei der Autolyse werden Reduktionswirkungen der Hefe selbst nach vollkommenem Abbau der Eiweißstoffe nicht sistiert, indes alle übrigen Fermente der Hefe, mit Ausnahme von Invertase, die ebenso stabil ist, hierbei zerstört werden.

Wir sind geneigt anzunehmen, daß die Anhäufung von Acetaldehyd bei der Zuckervergärung durch Dauerhefe in Gegenwart von Kadmiumsalzen mit der Hemmung der Reduktionsvorgänge zusammenhängt. Wir setzen voraus, daß Acetaldehyd auch beim normalen Verlaufe der Gärung entsteht, aber sofort in Äthylalkohol übergeht; da aber dieser Reduktionsvorgang in Gegenwart von Kadmiumsalzen gestört wird, so findet eine Anhäufung von Acetaldehyd statt.

Ganz unwahrscheinlich ist dagegen die Annahme, daß Acetaldehyd durch Oxydation aus Äthylalkohol hervorgeht. Wie bekannt, sind in Dauerhefen nur minimale Mengen der oxydierenden Fermente enthalten; andererseits sind Kadmium- und Zinksalze keine Aktivatoren der Oxydationsvorgänge. In Gegenwart von Kadmiumsalzen erfolgt in der Tat Aldehydbildung nicht nur bei Sauerstoffzutritt, sondern auch bei Sauerstoffabschluß, wie es z. B. folgender Versuch zeigt.

Nr. 8. Drei Portionen, A, B und C, zu je 10 g Trockenhefe, 10 g Rohrzucker, 0,219 g  $\text{CdCl}_2$  und 50 ccm Wasser.

	Portion A	
in der Luft . . . . .	Acetaldehyd	26,5 mg,
	Portion B	
im Wasserstoffe . . . . .	Acetaldehyd	30,7 mg,
	Portion C	
in $\text{CO}_2$ . . . . .	Acetaldehyd	24,1 mg.

Die abweichenden Resultate von Buchner, Langheld und Skraup<sup>1)</sup> haben wir also nicht bestätigen können.

<sup>1)</sup> E. Buchner, K. Langheld und S. Skraup, Chem. Ber. Bd. 47, S. 2550 (1914).



Übrigens ist auch in lebender Hefe eine direkte Oxydation von Äthylalkohol zu Acetaldehyd nicht sehr wahrscheinlich. A. Trillat und Sauton<sup>1)</sup> haben zwar eine Aldehydbildung durch gärende Hefe bei stark erhöhtem Luftzutritt erzielt, doch betonen die genannten Forscher ausdrücklich, daß die von ihnen künstlich hervorgerufene Alkoholoxydation mit den üblichen Bedingungen der Aldehydbildung nichts zu tun hat. Dauerhefen sind aber noch viel weniger fähig, Oxydationsvorgänge zu bewirken.

Bereits früher hat S. Kostytschew<sup>2)</sup> dargetan, daß in Gegenwart von Chlorzink eine Oxydation von Äthylalkohol zu Acetaldehyd durch Dauerhefe nicht wahrgenommen werden kann. Jetzt haben wir dieselben Versuche mit Kadmiumsalzen unternommen, und zwar wiederum mit negativem Resultate.

#### Nr. 9. Drei Portionen, A, B und C.

##### Portion A.

5 g Trockenhefe, 0,136 g CdBr<sub>2</sub> und 25 ccm 5%ige Rohrzuckerlösung:  
Acetaldehyd 27 mg.

##### Portion B.

5 g Trockenhefe, 0,136 g CdBr<sub>2</sub> und 25 ccm Wasser : Acetaldehyd 3 mg.

##### Portion C.

5 g Trockenhefe, 0,136 g CdBr<sub>2</sub> und 25 ccm 2,5%ige Alkohollösung:  
Acetaldehyd 5 mg.

Worauf beruht die ganz spezifische Wirkung der Kadmium- und Zinksalze auf Hefefermente? Es ist kaum zweifelhaft, daß hier eine Ionenreaktion vorliegt, denn nicht nur bewirken sämtliche Kadmium- und Zinksalze qualitativ eine und dieselbe Hemmung der Fermentwirkungen, sondern entstehen in Gegenwart gleicher Mengen von Metallionen gleiche Mengen von Acetaldehyd, gleichviel, welche Kadmium- und Zinksalze in Anwendung kommen. Dies wird durch folgende Versuche erläutert.

#### Nr. 10. Gleiche Portionen zu je 10 g Hefanol und 10 g

<sup>1)</sup> A. Trillat et Sauton, Comptes rendus Bd. 146, S. 996 (1908).

<sup>2)</sup> S. Kostytschew, Diese Zeitschr. Bd. 83, S. 100 (1913).

Rohrzucker in je 50 ccm 0,02 n. Lösung von verschiedenen Kadmiumsalzen. Versuchsdauer 3 Tage. Antiseptikum Toluol.

Kadmiumsalz	CO <sub>2</sub> in mg	Aldehyd in mg
CdCl <sub>2</sub> . . . . .	0,25	37
CdCl <sub>2</sub> . . . . .	0,25	36
CdBr <sub>2</sub> . . . . .	0,15	36
CdBr <sub>2</sub> . . . . .	0,17	34
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,40	35
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,43	34

Eine Kontrollportion in 0,02 n. Lösung von CdBr<sub>2</sub> ohne Zucker lieferte bloß 5 mg Acetaldehyd.

Nr. 11. Gleiche Portionen zu je 10 g Hefanol und 10 g Rohrzucker in je 50 ccm 0,02 n. Lösung von verschiedenen Zinksalzen. Versuchsdauer 3 Tage. Antiseptikum Toluol.

Zinksalz	CO <sub>2</sub> in mg	Acetaldehyd in mg
ZnCl <sub>2</sub> . . . . .	0,49	14
ZnCl <sub>2</sub> . . . . .	0,48	14
ZnBr <sub>2</sub> . . . . .	0,35	14
ZnJ <sub>2</sub> . . . . .	0,32	16
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,39	15
ZnSO <sub>4</sub> . . . . .	0,39	14
Zn(COO · CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,65	15
Zn(COO · CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,66	16
Zn(COO · CHOH · CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,67	16

Nr. 12. Gleiche Portionen zu je 15 g Hefanol und 15 g Rohrzucker in je 75 ccm 0,02 n. Lösung von verschiedenen Zinksalzen. Versuchsdauer 3 Tage. Antiseptikum Toluol.

Zinksalz	CO <sub>2</sub> in mg	Acetaldehyd in mg
ZnCl <sub>2</sub> . . . . .	0,84	23
ZnCl <sub>2</sub> . . . . .	0,83	23
ZnCl <sub>2</sub> . . . . .	0,97	22
ZnSO <sub>4</sub> . . . . .	0,71	24
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	0,70	22

Es ist also ersichtlich, daß gleiche Mengen von Zink- und Kadmiumionen gleiche Aldehydausbeuten bewirken und das Verhältnis der Mengen von Zinkionen zu denjenigen von gebildetem Aldehyd konstant ist. Dagegen ist die Hemmung der  $\text{CO}_2$ -Produktion keine Ionenreaktion.

Die in vorliegender Mitteilung beschriebenen Versuche sprechen wohl zu Gunsten der Annahme, daß Acetaldehyd durch Gärungsfermente gebildet wird. Andere in unserem Laboratorium ausgeführte Untersuchungen haben durch andere Kunstgriffe eine bedeutend größere Aldehydproduktion durch lebende Hefen und andere Gärungspilze dargetan. Die Beschreibung der einschlägigen Versuche bleibt den nächstfolgenden Mitteilungen vorbehalten. An dieser Stelle wollen wir ausdrücklich betonen, daß für den Nachweis der intermediären Gärungsprodukte künstliche Störungen des normalen Verlaufes der alkoholischen Gärung durchaus notwendig sind: An und für sich verläuft die Gärung so glatt, daß, wie bekannt, selbst eine genaue quantitative Zuckerbestimmung nach der Menge des durch Hefegärung entwickelten Kohlendioxydes ausgearbeitet worden war<sup>1)</sup>. Dieser Gedanke wurde bereits in früheren Mitteilungen über alkoholische Gärung des einen von uns ausgesprochen.

### Zusammenfassung der wichtigsten Resultate.

1. Kadmiumsalze bewirken eine gewaltige Veränderung des normalen Verlaufes der alkoholischen Gärung. Nur ein unbedeutender Teil des verschwundenen Zuckers geht in normale Gärungsprodukte, Alkohol und  $\text{CO}_2$ , über; die weitaus größere Zuckermenge wird in unbekannte Stoffe verwandelt. Hierbei entsteht auch Acetaldehyd in Ausbeuten, die  $\frac{1}{3}$  derjenigen des gebildeten Alkohols erreichen.

2. Sehr verdünnte Lösungen von Kadmiumsalzen üben einen direkten Einfluß auf Hefefermente aus. Proteolyse wird durch Kadmiumsalze nicht beeinträchtigt, Reduktasewirkung

<sup>1)</sup> Vgl. B. Tollens, Abderhalden's Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. 2, S. 141 (1910); K. Grube, ebenda S. 186.



dagegen stark gehemmt. Die Reduktion von Acetaldehyd zu Äthylalkohol durch Trockenhefe wird durch Gegenwart sehr geringer Mengen von Kadmiumsalzen eingestellt.

3. Acetaldehyd entsteht in Gegenwart von Kadmiumsalzen nicht nur bei Sauerstoffzutritt, sondern auch bei Sauerstoffabschluß.

4. Kadmiumsalze bewirken keine Oxydation von Äthylalkohol zu Acetaldehyd.

5. Die Wirkung von Kadmium- und Zinksalzen auf Hefefermente ist als eine direkte Ionenreaktion zu bezeichnen.

