

in der Pappen-, vielleicht auch in der Papier-Industrie, sollte am meisten Aussicht auf Erfolg haben⁸⁾, wobei anzustreben wäre, nicht nur den in manchen Schäben hohen Prozentsatz an Fasern zu verwerten, sondern die gesamten Schäben etwa in der Form nutzbar zu machen, wie man das Getreidestroh durch Kalkaufschluß zu Pappen verarbeitet. Erwogen wird zurzeit auch die Möglichkeit des hydrolytischen Abbaues der Schäben zu Zucker und der Weiterverarbeitung der vergärbaren Zucker zu Alkohol, Hefe oder dgl. Leider haben die Schäben verhältnismäßig viel Lignin

⁸⁾ F. Hoyer, Die Verarbeitungsmöglichkeit von Flachsschäben, Klepzig's Textil-Z. 89, 715 [1936].

Fettsynthese durch Pilze und Bakterien

Von Prof. Dr. W. SCHWARTZ

Botanisch-Mikrobiologisches Institut der T. H. Karlsruhe

Eingeg. 19. Februar 1937.

Während sich in der mikrobiologischen Literatur zahlreiche Angaben über die Zersetzung von Neutralfetten durch Pilze und Bakterien finden, liegen über die Fettsynthese, ihre Verbreitung und Abhängigkeit von den Wachstumsfaktoren verhältnismäßig wenig Untersuchungen vor.

Unter den älteren Arbeiten sind vor allem die Versuche von v. Nägeli und Loew (16) wichtig. Eine Reihe von Arbeiten stammt aus den Kriegsjahren, als schon einmal die Frage nach einer technisch verwertbaren Fettsynthese durch Pilze in Deutschland auftauchte (2, 5, 10, 11). In den letzten 20 Jahren ist das Gebiet verhältnismäßig wenig bearbeitet worden. Einige wertvolle Beiträge behandeln bei verschiedenen Pilzen und Bakterien die Beziehungen zwischen Kulturbedingungen und Fettsynthese (3a, 4, 4a, 14, 17, 18, 20). In diesem Zeitabschnitt ist auch der Kreis der untersuchten Pilze und Bakterien wenigstens etwas erweitert worden. Bis in die Kriegsjahre hat sich fast die gesamte Arbeit auf Saccharomyceten und Pseudosaccharomyceten, darunter besonders die von Lindner 1899 aufgefundene *Torula pulcherrima* (13), und auf den „Fettpilz“ *Endomyces vernalis* erstreckt, den Lindner (13) aus dem Schleimfluß einer Birke isoliert hat. Zu einer technischen Verwertung der Pläne Lindners, die sich neben der Fettgewinnung aus Pilzen übrigens auch auf eine Verarbeitung von Fäkalien und Dünger zu Fett auf dem Wege über das Fettgewebe von Fliegenlarven erstreckte (12), ist es nicht gekommen.

Neben Hefepilzen und den verwandten Endomyceten werden als Fettbildner besonders die Aspergillaceen (1, 8, 14, 16, 17, 18, 20) erwähnt. Überhaupt gibt es kaum eine Gruppe von Pilzen einschließlich der Flechtenpilze¹⁾, bei der nicht auch Fett als Zelleinschluß auftritt. Auch bei Bakterien ist die Fettbildung verbreitet. Zu den fettbildenden pflanzlichen Mikroorganismen gehören auch die Kieselalgen (Diatomeen). Zahlreiche Vertreter dieser Gruppe lassen sich ähnlich wie Pilze im Laboratorium kultivieren, allerdings mit dem wichtigen Unterschied, daß sie bei Lichtzutritt autotroph sind, also ihre Körpersubstanzen ausschließlich aus anorganischen Bausteinen bilden.

Häufig findet man in der Literatur nur qualitative Angaben über das Fettvorkommen, selten eingehendere Untersuchungen, so daß wir noch nicht abschätzen können, ob die Pilze, die bis heute als Werkzeug zu einer technischen Fettsynthese gedient haben, auch wirklich die geeignetsten sind oder besser durch andere ersetzt werden sollten.

Über die Zusammenhänge zwischen Kulturbedingungen und Fettbildung ergibt sich heute etwa

¹⁾ Die Flechten sind symbiontische Organismen; jede Flechte baut sich aus einem Pilz und einer Alge auf.

und Pentosan. Beim Hanf sind z. B. von 100 g Trockensubstanz nur 25–30 g vergärbbar, so daß auch dieser Möglichkeit gegenüber gewisse Vorbehalte zu machen sind.

Wir haben in großen Zügen jene Fragen gestreift, die zurzeit für die bastfasererzeugende Industrie besonders wichtig sind. Natürlich tauchen je nach den örtlichen Verhältnissen noch manche anderen auf, wie z. B. die einzelnen Typen der Röstbehälter, Bassin, Kanal, Bunker; ferner der Schutz der Betonwände durch Anstrichmittel und das Transportwesen. Diese Fragen treten jedoch gegenüber den oben behandelten an Bedeutung zurück. [A. 37.]

das folgende Bild (Tab. 1), das für die einzelnen genauer untersuchten Pilze und Bakterien zahlreiche gemeinsame Züge aufweist und ferner zeigt, wie weit wir von allgemeinen Feststellungen bereits zu exakten Formulierungen vorgeschritten sind.

Fast allgemein wird für die Fettbildung die große Bedeutung einer kräftigen C- und N-Nahrung bei höherer Temperatur und bei guter Sauerstoffversorgung hervorgehoben. Wenn man bei Pilzen, die eine Myceldecke bilden, die Fettausbeute aus dem in der Nährlösung gebotenen Ausgangsmaterial (z. B. Zucker) berechnet, so erweist sich ähnlich wie bei der Citronensäurebildung aus Zucker das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Nährlösung als mitbestimmend. Bei Sproßpilzen kann durch Lüftung der Nährlösung auch bei relativ kleinen Oberflächen die Ausbeute verbessert werden. Nur die Ansicht A. Meyers (15), daß bei Bakterien Sauerstoffmangel die Fettbildung günstig beeinflussen soll, fällt aus dem Rahmen der übrigen Angaben.

Andererseits deuten Beobachtungen von Henneberg (6) und anderen darauf hin, daß z. B. Bierhefen auch im Lagerfaß, also praktisch bei Sauerstoffabschluß, allmählich Fett in den Zellen anreichern. Man gewinnt den Eindruck, daß zwischen den einzelnen wirksamen Faktoren eine weitgehende Möglichkeit zur gegenseitigen Kompensation besteht. Es ist z. B. bei Bierhefe die untere Temperaturgrenze herabgesetzt bei Zellen, die im Gärungsschaum enthalten sind, also unter dem Einfluß einer günstigen Sauerstoffversorgung stehen (6).

Eine wirkliche Erklärung der Zusammenhänge mag vielleicht erst dann gelingen, wenn man die wechselnde biologische Bedeutung des Fettes und in Verbindung damit vielleicht auch einen Wechsel in der chemischen Zusammensetzung des Fettes bei ein und derselben Art von Organismen mit in Betracht zieht. Daß Schwankungen in der chemischen Zusammensetzung bestehen, scheint sicher zu sein. Es ist auch nach den Erfahrungen, die man bei dem Reservefett höherer Pflanzen über die Zusammenhänge zwischen Fettbeschaffenheit und Wachstumsbedingungen (Klima, Boden, Düngung) gemacht hat, nicht sonderlich überraschend, wenn etwa bei *Rhizopus nigricans* und besonders bei *Aspergillus niger* die Versuchstemperatur (17) oder bei *Oospora lactis* das Alter der Kulturen (3a) einen Einfluß auf die Zusammensetzung des Fettes hat, oder wenn das Mycelfett von *Penicillium javanicum* je nach dem Glucosegehalt der Nährlösung einen größeren oder kleineren Gehalt an freien Fettsäuren aufweist (20). Während aber bei höheren Pflanzen das Fett wohl immer als Reservestoff zu bewerten ist, scheint bei Pilzen und Bakterien auch

eine degenerative Verfettung der Zellen verbreitet zu sein (6, 8, 11), die vor allem in älteren Zellen zu einer besonders starken Anhäufung von Fett führen kann.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Bedingungen für beide Arten von Fettbildung verschieden sind. Die degenerative Verfettung der Zellen scheint z. B. nicht an eine Vermehrung der Zellen gebunden zu sein, während für die Bildung von Reservefett kräftiges Wachstum ein wichtiger Faktor ist. Es bestehen ja z. B. auch Beziehungen zwischen Einsaatmenge und Fettbildung: je geringer die Hefeinsaat ist, je günstiger also die Wachstumsbedingungen für die einzelne Zelle sind, desto höher der Fettgehalt der Ernte (6). Bei Einzelkultur in mineralischer Lösung im hängenden Tröpfchen können sich die Verhältnisse wieder ändern, was auf sekundäre Schädigungen der Zellen hindeutet, vielleicht auch darauf, daß zwischen Sauerstoffversorgung und Hefeinsaat bestimmte Beziehungen bestehen müssen, wenn das Wachstum in Gang kommen soll. Nach Erfahrungen bei Aspergillaceen (20) und bei Pilzen aus der Gattung Oospora (4a) scheint es auch für das Verhältnis Oberfläche/Volumen der Nährlösung ein Optimum zu geben, nach dessen Überschreiten die Fettbildung weniger gut ist.

Sind die Bedingungen für eine Fettbildung günstig, so entstehen in den Zellen, eingelagert in das Cytoplasma, zunächst kleine Fettvakuolen, die sich allmählich vergrößern und schließlich zu einem oder mehreren großen Tröpfchen eines bei Zimmertemperatur flüssigen Fettes zusammenfließen können.

Über die chemische Beschaffenheit des Fettes und der Fettsäuren finden sich zahlreiche Angaben in

der Literatur. Genannt werden z. B. Stearin-, Palmitin- und Ölsäure (19a), ferner zahlreiche Fettsäuren, die für einzelne Pilze oder Bakterien charakteristisch sind.

Auf welchen Wegen die oben erwähnten Bedingungen auf die Fettsynthese einwirken, wissen wir nicht. Es ist nicht einmal sicher, ob die einzelnen Phasen der Fettbildung, die Erzeugung von Glycerin und von höheren Fettsäuren und die Veresterung in gleicher Weise von den Außenbedingungen abhängen. Der ganze Prozeß ist an den lebenden Protoplasten gebunden und wird in seinem letzten Abschnitt vielleicht ähnlich wie im Modellversuch bei höheren Pflanzen (19) durch eine gewisse Wasserarmut begünstigt. Ein experimenteller Beweis für die Richtigkeit des theoretisch wahrscheinlichsten Aufbaus der C-Ketten höherer Fettsäuren aus Hexosen bzw. Triosen oder aus C_3 -Ketten wie z. B. Acetaldehyd, durch wiederholte Aldolkondensation und eine abschließende Dismutation konnte bis jetzt nicht erbracht werden.

Die Angaben über die Ausbeute sind recht widerspruchsvoll, wozu neben der Vielheit der Versuchsbedingungen besonders auch die Verschiedenartigkeit der Methoden zur quantitativen Fettbestimmung und die teilweise Einbeziehung wachsartiger Stoffe beiträgt. Für Preßhefe werden 5—12,5%, für untergärrige Hefen 1,3 bis 12,6%, für Endomyces und Mycobacterium tuberculosis (typus humanus) 40% und mehr, für Penicillium bis 50%, bezogen auf Trockensubstanz der Ernte, angegeben (6), für die Fruchtkörper von Hutzpilzen etwa 1,5—6% (21), für die Sklerotien des Mutterkornpilzes Claviceps purpurea 30—35% (21). Bezogen auf das Nährsubstrat beträgt die

Tabelle 1. Bedingungen der Fettbildung bei einigen Pilzen und Bakterien.

	Hefen, besonders untergärrige Brauereihefen und Torula-Arten	Endomyces vernalis	Aspergillaceen, besonders Penicilliumarten	Hymenomyceten	Bakterien
Temperatur	Mindestens 12—15° (2, 22). Günstiger Temperaturbereich 20—30° (22)		30° bei P. javanicum (14), 34° bei Asp. niger (18)		
Sauerstoffversorgung, Lüftung	Reichliche Sauerstoffversorgung (11, 16). Bodensatzhefe ohne Lüftung zeigt schlechte Fettbildung (11). Zusatz von H_2O_2 zur Nährlösung begünstigt Fettbildung (2)	Große Oberfläche, dünne Flüssigkeitsschicht (10, 13)	Reichliche Sauerstoffversorgung (16). Luftüberdruck verhindert Wachstum (14). Vergrößerung der Verhältniszahl Oberfläche/Volumen von 0,103 auf 0,413 verbessert bei P. javanicum Ausbeute von 32 auf 52 mg Fett je g Glucose (14)	Reichliche Sauerstoffversorgung in Objektträgerkultur (8)	Kultur bei Sauerstoffmangel wirkt günstig (15). Fettspeicherung bei guter Sauerstoffversorgung in Tröpfchenkultur (6, Bac. Megatherium, mycoides)
Zusammensetzung des Nährsubstrates, bes. C- und N-Quelle, Reaktion	Reichliche C- und N-Ernährung. Harn bei Gegenwart von Kohlenhydraten (2). Glykogen, verschiedene Zucker, Alkohol, Glycerin, milchsaures NH_4 als C-Quellen (2, 11, 6). Würzeagar + 2% Maltose (22). Torula lipofera zeigt maß. Fettbildung auf Peptonagar + 1% Glucose (3).	Kräftige Ernährung fördert Fettbildung (22, End. Magnusii). Abwasser, pflanzliche Rückstände von Heine als Substrat vorgeschlagen (5). Kartoffeln (7). Sulfitablauge (13). Reichliche Ernährung mit Kohlenhydraten, z. B. mit verdünnter Melasse (10).	Fettbildung aus NH_4 -Salzen org. Säuren, Aminosäuren, Eiweiß, Zucker (18). Anorganische Nährlösung mit 0,2% KNO_3 und 5% Zucker (1). Nährlösung nach Molhard mit NH_4NO_3 oder KNO_3 (18, Asp. niger). Bei etwa 30% Glucose in anorganischer Nährlösung mit 2,25 g NH_4NO_3 /l höchste Ausbeute. Optimum für Fettsynthese u. Wachstum fallen nicht zusammen. Reaktionsbereich für Fettbildung pH 3,1—6,8, für Wachstum 2,1—7,3. Anorg. Katalysatoren erhöhen Zuckerverbrauch, Pilzernte, Fett- und Citronensäurebildung (14, P. javanicum).	Würzeagar. Ölsaures Na, besonders mit Glycerinzusatz (8).	Peptonglycerinbouillon. Anorganische Nährlösung mit Asparagin, Glycerin und Na-Citrat (4, 9). Zuckerzusatze zu dieser Nährlösung begünstigt Fettbildung. Salze seltener Erden vermindern Fettbildung, dergleichen Ersatz des Glycerins durch Mannit (4, Mycobact. tuberculosis).
Zeitlicher Verlauf der Fettsynthese, Lokalisation.	In alten Zellen zunehmende Fettspeicherung (2, 23).	Gegen Ende der Entwicklung in fast allen an der Luft gewachsenen Zellen der Pilzdecke (10). In älteren Kulturen (22, End. Magnusii).	Bei Asp. niger Maximum nach 72 h erreicht, meist gleichzeitig mit maximalem Erntegewicht (18). Bei P. javanicum Maximum nach etwa 20 Tagen, annähernd gleichzeitig mit stärkster Citronensäure-Anhäufung; Höchsternte an Pilzsubstanz erst nach etwa 60 Tagen (14).		

Ausbeute z. B. bei Oospora („Milchschnitz“) 3–5 kg Fett je 1000 l Molke (4a) oder nach anderen Versuchen 14,35 g Rohfett je 100 g Zucker (3a). Unter den saprophytisch lebenden Bakterien sind gute Fettbildner, z. B. *Bacillus mycoides* und *Megatherium* (6, 15).

Außerordentliche Höhe können die Fettablagerungen in den Ölhypen mancher Krustenflechten erreichen, ob allerdings Gehalte von 80% der Flechten-Trockensubstanz vorkommen, bedarf noch der Nachprüfung.

Wie wichtig die Ergänzung des mikroskopischen Befundes durch eine genaue chemische Analyse ist, geht z. B. aus den Untersuchungen von Kordes (8) an dem Hutzpilz *Daedalia quercina* hervor, der neben Fett große Mengen von harzartigen Körpern bildet oder aus den Ermittlungen über das „Neutralfett“ der Tuberkelbakterien, das nach Anderson kein Glycerid, sondern ein komplexer Ester von Fettsäuren mit Trehalose sein soll (9).

Was schließlich das Problem einer technischen Fettsynthese durch Mikroorganismen zu wirtschaftlich tragbaren Bedingungen anbetrifft, so hängt dessen Lösung wesentlich von einer befriedigenden Klärung folgender Teilfragen ab: Vor allem kommt es auf die Wahl eines geeigneten „Fettbildners“ an, der bei experimenteller Beherrschung der Zusammenhänge zwischen Kulturbedingungen und Fettsynthese eine hohe, reproduzierbare Ausbeute ergibt. Was sich hier erreichen läßt, zeigt auf einem anderen Gebiet die Steigerung der Citronensäureausbeute durch *Aspergillus niger* von etwa 45 auf 70%. Bei mycelbildenden Pilzen, die den Hefepilzen an Leistungsfähigkeit überlegen sein dürften, könnte auch die Erzielung eines günstigen Verhältnisses zwischen Oberfläche und Volumen im Großversuch eine wesentliche Bedeutung erlangen.

Ferner scheint der Gehalt der Nährlösung an Katalysatoren Einfluß auf die Fettsynthese zu haben. Schließlich bleibt noch als wichtigster Punkt die Frage nach der chemischen Zusammensetzung des Nährsubstrates, besonders nach dem Ausgangsmaterial für die Fettsynthese.

Hier wäre ein großer Fortschritt erzielt, wenn es gelänge, den Bereich der für Pilze und Bakterien im allgemeinen

geeigneten Ausgangsmaterialien, wie Stärke, Zucker, Melasse, grundsätzlich zu erweitern, indem man pektin- oder cellulosehaltige Pflanzenreste oder Holzabfälle der direkten mikrobiologischen Verwertung zugänglich macht.

Der Weg, der zu einer im technischen Maßstab anwendbaren mikrobiologischen Fettsynthese führt, läßt sich in seinen wichtigsten Abschnitten einigermaßen überblicken. Es ist nur eine Frage der Zeit und der Ausdauer, wann wir das Ziel erreichen. [A. 33.]

Schrifttum.

- (1) H. H. Barber, J. Soc. chem. Ind., Chem. & Ind. **46**, 200 T [1927]. — (2) Th. Bokorny, Beih. Bot. C. I. **35**, 171 [1918]. — (3) L. E. den Dooren de Jong, Nederl. Tijdschr. Hyg. Microb. Serol. **1**, 136 [1926]. — (3a) H. Fink, G. Haeseler, M. Schmidt, Wschr. Brauerei **54**, 89, 100 [1937]. — (4) A. Frouin, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci., **170**, 1471 [1920]. — (4a) H. Geffers, Arch. Mikrobiol. **8**, 66 [1937]. — (5) B. Heinze, Jber. Ver. angew. Bot. **15**, 1 [1917]. — (6) W. Henneberg: Handb. d. Gärungsbakteriologie Bd. 1, Berlin 1926. — (7) A. G. Konokotina, L. V. Savskinskaja u. G. E. Schultze, Bull. State Inst. Agr. Microb. U.S.S.R. **5**, 142 [1933]. — (8) H. Kordes, Botanisch. Arch. **3**, 282 [1923]. — (9) Nach Fr. Lindner in Medizin u. Chemie, Leverkusen, 1934, Bd. 2, S. 329. — (10) P. Lindner, Ber. dtsh. bot. Ges. **33**, 388 [1915]. — (11) P. Lindner u. T. Unger, Z. techn. Biol. **7**, 68 [1919]. — (12) P. Lindner, ebenda **7**, 213 [1919], **8**, 58 [1921]. — (13) P. Lindner, diese Ztschr. **35**, 110 [1922]. — (14) L. B. Lockwood, G. E. Ward, O. E. May, H. T. Herrick, H. T. O'Neill, Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. II **90**, 411 [1934]. — (15) A. Meyer: Die Zelle der Bakterien, Jena 1912. — (16) v. Nägeli u. O. Loew, S.-B. math.-physikal. Kl. d. Bayr. Akad. Wiss. Bd. IX, Heft III, 287 [1879]. — (17) L. K. Pearson u. H. S. Raper, Biochemical J. **21**, 875 [1927]. — (18) Ch. Pontillon, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci., **191**, 1148 [1930]. — (19) L. Spiegel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **127**, 208 [1923]. — (19a) K. Täufel, H. Thaler u. H. Schreyegg, Z. Unters. Lebensmittel **72**, 394 [1936]; Fette u. Seifen **44**, 34 [1937]. — (20) G. E. Ward, L. B. Lockwood, O. E. May u. H. T. Herrick, Ind. Engng. Chem. **27**, 318 [1935]. — (21) J. Zellner: Chemie der höheren Pilze, Leipzig 1907. — (22) H. Zikes, Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. II **49**, 353 [1919]. — (23) H. Zikes, ebenda [II] **57**, 21 [1922].

Analytisch-technische Untersuchungen

Versuche zur Ölbestimmung in Leinsaat nach der Refraktometermethode von Leithe

Von Dr.-Ing. LUDWIG LOMPE

Deutsches Forschungsinstitut für Bastfasern, Sorau

Eingeg. 4. Januar 1937

In dieser Zeitschrift¹⁾ beschrieb W. Leithe eine refraktometrische Schnellmethode zur Fettbestimmung in Ölsamen, die mit erheblich kleinerer Saatmenge auszukommen gestattet als das Extraktionsverfahren. Nach seiner Angabe wird die Probe mit Benzin vom Siedepunkt 90–100° 2 min lang geschüttelt, zentrifugiert und aus der Zunahme der Lichtbrechung der Fettlösung im Zeisschen Eintauchrefraktometer, Prisma III, der Fettgehalt berechnet.

Die Anwendung des Verfahrens auf die Untersuchung von Leinsamen erscheint aus verschiedenen Gründen mit Schwierigkeiten verknüpft; denn die Grundlage der refraktometrischen Analyse, der Brechungsindex, ist für Leinöl

¹⁾ Leithe, „Über eine refraktometrische Makro- und Mikroschnellmethode zur Fettbestimmung in Ölsamen.“ diese Ztschr. **47**, 734 [1934]; vgl. auch Leithe u. Müller, „Die refraktometr. Fettbestimmung in deutscher Soja.“ ebenda **48**, 414 [1935].

von Flachs verschiedener Herkunft keineswegs gleich. Zudem bestehen zwischen den Samen von Faserleinen und Ölleinen hinsichtlich der Menge und der Kennzahlen des Öles Unterschiede.

Zur Klärung der Frage, ob die Leithesche Refraktometermethode auch für eine Ölbestimmung von Leinsamen die Extinktionsmethode ersetzen kann, wurden daher vor längerer Zeit (z. T. gemeinsam mit Dipl.-Ing. Müller) Versuche durchgeführt, von denen einige Ergebnisse mitgeteilt seien. Für die Untersuchungen stand ein Eintauchrefraktometer der Firma Carl Zeiss, Jena, zur Verfügung, wofür an dieser Stelle gedankt sei.

Die Temperaturabhängigkeit der Grenzlinie der Totalreflexion für Benzin (Siedepunktintervall 90–100°, $n_D^{17,5} = 1,3967$) und eine Leinöllösung, hergestellt mit frischem käuflichem Leinöl, ist in Tab. 1 angegeben; weiter sind die Differenzen aus den Refraktometeranzeigen der Leinöl-