

Biologische Fettsynthese*)

Von Dozent Dr. L. REICHEL, Dresden

Historisches zur Fettsynthese aus Kohlenhydraten und Eiweiß¹⁾.

Zur Bildung von Fett ist sowohl der tierische als auch der pflanzliche Organismus befähigt. Im tierischen Organismus stellten zuerst *Lawes* u. *Gilbert*²⁾ 1853 in Versuchen am Schwein Fettbildung durch Kohlenhydratfütterung fest. Dieser Befund wurde wiederholt bestätigt, so z. B. von *Lehmann* u. *Voit*³⁾, *Leathes*⁴⁾ und besonders von *Wierzuchowski* u. *Ling*⁵⁾, die Gaswechsel- und Fütterungsversuche am Schwein durchgeführt haben. Dabei wurde gefunden, daß der Respirationsquotient 1,58 beträgt. Der RQ ist also für die Umwandlung der Kohlenhydrate größer als 1, d. h. es wird mehr Sauerstoff in Form von Kohlendioxyd abgegeben, als der Menge des eingeatmeten Sauerstoffs entspricht. Dies kann nur darauf zurückgeführt werden, daß eine Überführung sauerstoffreicher Verbindungen (Kohlenhydrate) in sauerstoffärmeren Verbindungen (Fette) stattgefunden hat. Beim wachsenden Schwein entstehen aus Kohlenhydraten pro Tag etwa 125 g Fett.

Im pflanzlichen Organismus, u. zw. im reifenden Samen der *Paeonia*, hat *W. Pfeffer*⁶⁾ 1878 die Bildung von Fett aus aufgespeicherter Stärke beobachtet. *C. Gerber*⁷⁾ hat 1897 diese Abwandlung von Kohlenhydraten in Fett im reifenden Öl-samen durch Messungen des RQ erhärtet. Weiterhin zeigte *P. Lindner*⁸⁾, daß gewisse Hefen oder hefeartige Pilze in Zuckerlösungen bei starker Luftzufuhr einer reichlichen Verfettung unterliegen. Schließlich hat ebenfalls *P. Lindner* erkannt, daß der Schimmelpilz *Endomyces vernalis* ein besonders guter Fettbildner ist. Mit diesem Schimmelpilz haben sodann *H. Haehn* u. *W. Kintof*⁹⁾ die Fettbildung aus Kohlenhydraten quantitativ zu erfassen versucht. Ihre Bestimmungen des Fettgehaltes der Pilzhaut, die auf Bierwürze und Hefe-extrakt gezüchtet wurde, lieferten durchschnittliche Werte von 25 % Fett ber. auf Triolein. Mit anderen Schimmelpilzen, u. zw. einer Reihe von *Aspergillus-Penicillium*-Arten, haben *G. E. Ward*, *L. B. Lockwood*, *O. E. May* und *H. T. Herrick*¹⁰⁾ den Aufbau der Fette aus Kohlenhydraten ausgeführt. *Penicillium javanicum* z. B. lieferte unter geeigneten Kulturbedingungen bis zu 41 % Fett. In der letzten Zeit arbeiteten *H. Fink*, *G. Haeseler* u. *M. Schmidt*¹¹⁾, ferner unabhängig davon *H. Geffers*¹²⁾ mit Oidium-Arten. Mit verschiedenen Gattungsarten wurden Fettmengen von 12—50 % erzielt.

Außer aus Kohlenhydraten wird im tierischen und pflanzlichen Organismus die Fettbildung auch aus Eiweiß bewerkstelligt. Nach *Anderson* u. *Mendell*¹³⁾ wird im Rattenorganismus bei reiner Eiweißfütterung reichlich Fett gebildet. Dieses Fett hat die gleichen physiologischen Eigenschaften wie das aus Kohlenhydraten entstehende. In *Penicillium*-arten stellten *C. v. Nägeli* u. *O. Loew*¹⁴⁾ bereits 1880 die direkte Fettbildung aus Eiweißstoffen fest. Gearbeitet wurde mit Albuminen oder Aminosäuren, wie Asparagin und Leucin.

Die Zusammensetzung der gebildeten Fette ist i. allg. stark abhängig von den Bedingungen, daher haben die Fette wechselnde Zusammensetzung. Am Aufbau der Fette sind hauptsächlich Ölsäure, Linolsäure, Palmitinsäure und Stearin-säure beteiligt, also Fettsäuren der Reihe C_{16} und C_{18} .

*) Vorgetragen vor dem Bezirksverein Dresden des VDCh am 18. Juni 1940.

1) Vgl. a. *Schwarz*, „Fettsynthese durch Pilze u. Bakterien“, diese Ztschr. **50**, 294 [1987].

2) J. Roy. Agric. Soc. **14**, 439 [1853].

3) Z. Biol. **42**, 619 [1901].

4) Ergebn. Physiol., bioch. exp. Pharmakol. **8**, 856 [1909].

5) J. biol. Chemistry **64**, 697 [1925].

6) Jb. wiss. Bot. **8**, 510 [1878].

7) C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **135**, 658, 732 [1897].

8) Z. techn. Biol. **7**, 68 [1919]; **8**, 56 [1920]; **9**, 100 [1921]; diese Ztschr. **35**, 110 [1922].

9) Ber. dtsch. chem. Ges. **56**, 439 [1923]; Chemie d. Zelle u. Gewebe **12**, 115 [1926].

10) Ind. Engng. Chem. **27**, 318 [1935].

11) Z. Spiritusind. **60**, 74, 82 [1937].

12) Arch. Mikrobiol. **8**, 66 [1937].

13) J. biol. Chemistry **76**, 782 [1928].

14) J. prakt. Chem. **21**, 97 [1880].

aus normalen Ketten mit gerader C-Atom-Zahl. Weitaus am häufigsten tritt uns die ungesättigte Säure mit 18 C-Atomen entgegen, bei den Tieren in Form der Ölsäure, bei den Pflanzen überwiegend in Form der Linol- und Linolensäure.

Für die biologische Umwandlung von Kohlenhydraten in Fett brauchen wir hauptsächlich B-Vitamine und Vitamin C. So ist z. B. Vitamin B₁, das Aneurin, wie *K. Lohmann* u. *Schuster*¹⁵⁾ festgestellt haben, in Form seines Pyrophosphorsäureesters als Co-Ferment der Carboxylase wirksam. Fehlt dieses Vitamin, so können die Kohlenhydrate nur bis zur Brenztraubensäure abgebaut werden, die sich dann im Gewebe anhäuft¹⁶⁾. Die Decarboxylierung der Brenztraubensäure zum Acetaldehyd ist somit gestört. Acetaldehyd ist aber die höchstwichtige Zwischenstufe, von welcher der Aufbau der Fettsäuren seinen Ausgang nimmt (s. S. 579).

Technische Verfahren zur biologischen Fetterzeugung.

Während des Weltkrieges wurde mit dem Pilz *Endomyces vernalis* in großtechnischem Maßstabe Fett hergestellt (*P. Lindner*). Von den einzelnen ausgearbeiteten Verfahren hat nur das sog. Schalenverfahren Bedeutung erlangt, weshalb nur dieses hier Erwähnung finden soll.

Bei diesem Verfahren wird in großen, in Holzgestellen mehrfach übereinander geschichteten, flachen Schalen aus Magnalium oder Emaille, die mit sterilisierter, zuckerhaltiger Nährösung (z. B. Melasse, Sulfitablauge, Holzzuckerwürze) beschickt sind, unverfettetes Pilzmaterial ausgesät. Wenn nach 2—3 Tagen eine geschlossene Pilzdecke ausgebildet ist, wird, nachdem die alte Substratösung abgegossen, mit neuer vorsichtig unterschichtet. Bei 18—20° wird das Maximum der Fettbildung nach etwa 7 Tagen erreicht. Die Pilzdecken werden nach Abgießen der Nährösung mit Wasser gewaschen.

Dieses fetthaltige Pilzmaterial diente während des Weltkrieges zur Herstellung einer Nährpaste; sie war im Handel unter den Namen Everal, Myceta und wurde zum Backen, Kochen und als Brotaufstrich verwendet. Die Paste hält sich unter Ausschluß von Luft lange Zeit frisch.

Für die Darstellung von Fett sind die Pilzdecken getrocknet worden. Aus dem Trockenmaterial wurde nach verschiedenen Verfahren entweder Speisefett oder technisches Fett erhalten. Auf verbrauchten Zucker berechnet, betragen die Fettausbeuten mit Melasse etwa 12 % Fett, mit Sulfitablauge unter Zusatz stickstoffhaltiger Zuschläge etwa 18 % Fett. Das aus technischen Versuchen gewonnene *Endomyces*-Fett stellt ein rötl-ch-gelbes Öl dar, das wegen seines stark ungesättigten Charakters schnell ranzig wird. Es besteht zum größten Teil aus Neutralfett und 6—8 % freien Fettsäuren. Verdaulich sind 87 % des Fettes (Verdauungskoeffizient anderer Nahrungs-fette 90 %).

Nach Beendigung des Weltkrieges wurde die Gewinnung von Fett nach dem Schalenverfahren, welches am Berliner Institut für Gärungsgewerbe entwickelt worden war, wieder eingestellt. Das Verfahren war unwirtschaftlich hauptsächlich dadurch, daß der Pilz nur auf Oberflächen zu züchten war. Die Oberflächenfrage konnte nicht in tragbarer Form gelöst werden. Außerordentlich hoch sind nach dem Schalenverfahren auch die Anlage- und Betriebskosten (Handarbeit). Zu erwähnen ist schließlich noch, daß das Pilzmaterial in den offenen Schalen sehr häufig starken Infektionen unterlag, wodurch die Ausbeuten stark gemindert wurden¹⁷⁾.

Versuche zur Fettgewinnung sind in den letzten Jahren von *H. Fink* u. Mitarb.^{11, 17)} im Institut für Gärungsgewerbe in Berlin wieder aufgenommen worden. Auf der Suche nach besonders guten und infektionsstarken Fettbildnern stießen

15) Naturwiss. **25**, 26 [1937].

16) Peters, Biochemic. J. **30**, 2206 [1936]; Johnson, ebenda **30**, 31 [1936]; Sherman u. Elvehjem, Amer. J. Physiol. **117**, 142 [1936].

17) Näheres hierüber vgl. *H. Fink*, Forschungsdienst **5**, 115 [1938]; s. a. *W. Franke*, Z. ges. Naturwiss. **8**, 112 [1940].

diese Forscher auf Oidium Lactis, Stamm Oospora „Milchschimmel“. Für Oospora sind Molken allein oder im Gemisch mit anderen Kohlenhydratquellen das natürliche Nährsubstrat. Oospora ist gegen Infektionen besonders widerstandsfähig und nutzt im Gegensatz zu Endomyces die Nährsubstrate gut aus. Auch der Ertrag an Rohfett, bezogen auf die Fläche und Zeiteinheit, ist besser. Nach 6 Tagen wurden 22,5 % Fett (bezogen auf Trockensubstanz), nach 4 Tagen bereits 13,4 % Fett erzielt.

Diesem Verfahren stehen wiederum für die technische Durchführung die Anwendung der vielen Schalen, die für das ungestörte Oberflächenwachstum des Pilzes erforderlich sind, und die ausgedehnte teure Handarbeit hindernd im Wege. Außerdem dürften gerade im Kriegsfalle Molken nicht für diese Zwecke zur Verfügung stehen.

Das Problem einer technischen Fettsynthese durch Mikroorganismen zu wirtschaftlich tragbaren Bedingungen ist zurzeit noch nicht gelöst. Die technisch biologische Fettsynthese ist aber ein Problem, das nicht unlösbar ist.

Versuchsteil.

Über den Umbau von Kohlenhydraten zu Fettsäuren bzw. Fett sind verschiedene Theorien aufgestellt worden. *E. Fischer*¹⁸⁾ vertrat die Ansicht, daß das Fettsäuremolekül durch direkte Verknüpfung von Kohlenhydratmolekülen und folgende Reduktion der Hydroxyle entsteht. Danach soll sich z. B. die Stearinsäure durch Kondensation von 3 Hexosemolekülen, die Palmitinsäure aus 2 Pentosen und einer Hexose bilden. Dieselbe Ansicht vertritt auch *W. Klenk*¹⁹⁾, indem er annimmt, daß Fettsäuren mit 24 C-Atomen direkt aus Hexosen synthetisiert werden.

Nach *J. Smedley*²⁰), *H. v. Euler*²¹), *Nencki*²²), *S. Raper*²³), *Haehn* u. *Kintopf*⁹) soll das Fettsäuremolekül aus Kohlenhydratpaltprodukten, z. B. Brenztraubensäure, Acetaldehyd, aufgebaut werden. Da aber keine Theorie entsprechend experimentell untermauert ist, hat *L. Reichel* mit *W. Reinmuth* und *O. Schmid*²⁴) das Studium der Biosynthese von Fettsäuren und Fett erneut mit dem Schimmelpilz *Endomyces vernalis* aufgenommen.

Auf Grund der Beobachtungen von Lindner, daß Hefepilze aus Alkohol und Zucker Fett zu bilden imstande sind, hat Haehn²⁵) 1921 gefolgt, daß die Fettbildung über Acetaldehyd geht. Um diese Vorstellung zu stützen, wurde mit Kinttof eine größere Arbeit ausgeführt, welche 1925 zur Veröffentlichung gelangte⁹). Sie fanden Fett nach Verfütterung von Rohrzucker, Glucose, Brenztraubensäure, Milchsäure, Äthylalkohol, Acetaldehyd und Glycerin an *Endomyces vernalis*. Den Fettbildungsprozeß erklären sie in der Weise, daß Glucose nach dem Gärungsschema in Glycerin und Brenztraubensäure umgewandelt wird, Brenztraubensäure wird decarboxyliert und Acetaldehyd gebildet. Die weitere Synthese der Fettsäure wird durch Kondensations- und Oxydoreduktionsvorgänge nach nebenstehendem Schema vollzogen.

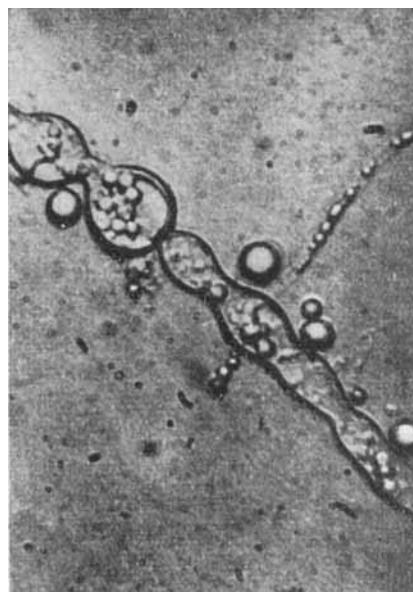
Ob vom Acetaldehyd bis zu den Fettsäuren diese angenommenen Zwischenstufen in der Tat durchlaufen werden, ist von *Haehn* u. *Kintlof* nicht experimentell belegt worden.

Für die eigenen Versuche haben wir praktisch fettfreie Kulturen von *Endomyces vernalis* auf reinem Hefewasser oder Hefewasser mit ganz geringem Rohrzuckerzusatz gezüchtet und das Pilzmaterial zunächst auf verschiedene Zuckerlösungen aufgeimpft. Beobachtet man unter dem Mikroskop Zellen, so sieht man darin bereits nach 24 h Fetttröpfchen, welche sich von Tag zu Tag vergrößern (siehe Abbildung).

Der Grad der Verfettung wurde nach 5 Tagen bestimmt (Tab. 1).

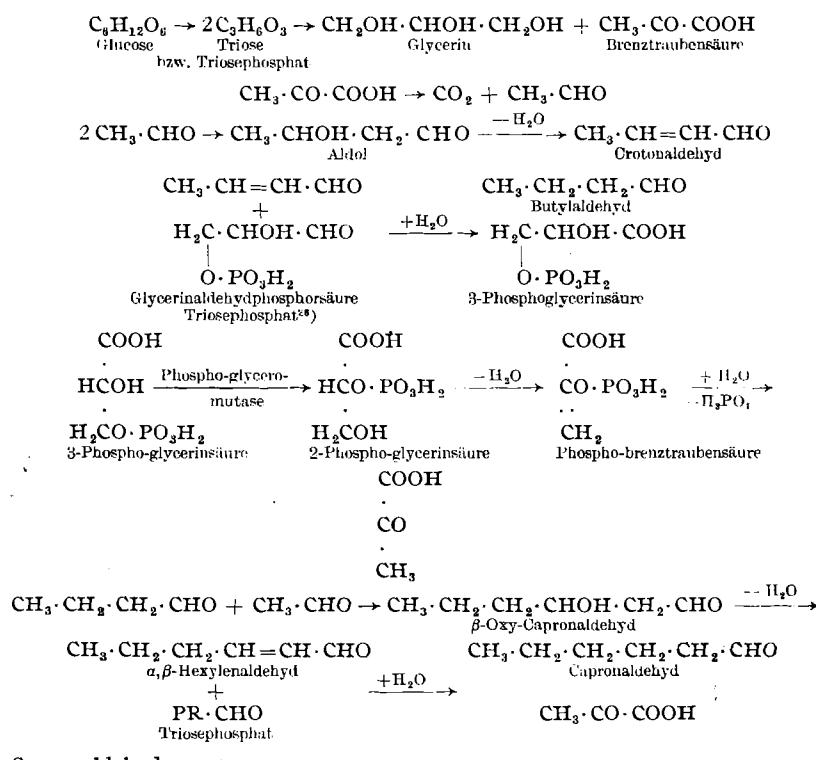
Tabelle 1.

Nährlösung	% Fett ber. auf Triolein	% freie Fettsäure ber. auf Ölsäure
Hefewasser	0,08	
1,5%ige Glucoselösung	7,2	5,0
1,5%ige Fructoselösung	12,2	7,1
4,0%ige Fructoselösung	9,7	7,9
1,5%ige Rohrzuckerlösung	11,75	6,8



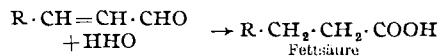
Endomyces vernalis nach Rohrzuckerfütterung mit Fetttröpfchen (800fach vergrößert.)

Danach sind besonders Fructose und Rohrzucker gute Fettbildner. Neben Fett sind stets freie Fettsäuren vorhanden. Unsere Bilanzversuche haben ergeben, daß bei Glucose und



Capronaldehyd

1. Weitere Anlagerung von Acetaldehyd bis zur Ölsäure bzw. Stearinsäure.
 2. Drei Moleküle Capronaldehyd (bzw. Hexadienal) → Aldehyd der Öl- bzw. Stearinsäure.



Der erste Weg wird für wahrscheinlicher gehalten.

²⁶⁾ Die Phosphorisierungsvorgänge wurden vom Vf. in das Schema mit aufgenommen.

Fructose etwa nur der vierte Teil des verbrauchten Zuckers der Fettsäure bzw. Fettbildung zugute kommt.

Zur quantitativen Fettbestimmung haben *Haehn* u. *Kintto*¹⁹⁾ die getrocknete Pilzhaut nach der Methode von *Stockhausen* u. *Ericson* mit Alkali aufgeschlossen und die entstehenden Fettsäuren mit Lauge titriert. Dieses Verfahren haben wir nachgeprüft und gefunden, daß es für kleine Fettmengen ungeeignet ist, daß außerdem beim Schmelzen auch aus anderen Anteilen der Pilzhaut saure Bestandteile gebildet werden. Die auf diese Weise hervorgerufenen Fehler betragen im Durchschnitt 8%. Für unsere Arbeiten haben wir eine genaue Halbmikro-Fettbestimmungsmethode ausgearbeitet und hierzu die *Ricinuslipase* herangezogen²⁷⁾.

Zur Bestimmung von Fett und Fettsäure in der Pilzhaut sind wir so vorgegangen, daß diese bei 50—70° i. V. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Um alles vorhandene Fett restlos aus den Zellen zu extrahieren, muß die Pilzmasse mit Quarzsand fein verrieben werden. Zur Extraktion wird das Mahlgut 6—8 h mit reinem Petroläther behandelt. Der nach dem Verdampfen des Petroläthers hinterbleibende Rückstand wird in einer bestimmten Menge Ligroin aufgenommen. In einem Anteil dieser Lösung wird nach lipatischer Spaltung der Laugenverbrauch ermittelt. Ein anderer Anteil wird für die Bestimmung der freien Fettsäuren direkt mit Lauge titriert. Aus der Differenz Gesamtfettsäure-freie Fettsäure errechnet sich die Fettmenge.

Um über den Verlauf der Synthese von höheren Fettsäuren nähere Anhaltspunkte zu gewinnen, haben wir in zahlreichen Einzelversuchen die Assimilierbarkeit von höheren gesättigten und ungesättigten Aldehyden, die als Zwischenstufen in Betracht kommen, geprüft. Dabei hat sich gezeigt, daß die höheren gesättigten Aldehyde, z. B. Octylaldehyd, Decylaldehyd, lediglich zu den entsprechenden Säuren autoxydiert werden. Hexylaldehyd lieferte keine Säure, daraus folgt, daß nur die höheren Aldehyde der Autoxydation unterliegen. Im Gegensatz zu den gesättigten Aldehyden waren mit den reaktiveren, ungesättigten Aldehyden andere Ergebnisse zu erwarten. In der Tat werden ungesättigte Aldehyde, wie z. B. Hexadienal, Octatrienal, durch Endomyces vernalis in höhere Fettsäuren verwandelt, was wir durch Ermittlung eindeutiger Äquivalentwerte festlegen konnten. Bei Hexadienal (M. G. 96) betragen die Äquivalentwerte 284, 311, 327, d. h. 3 Moleküle wurden kondensiert und der gebildete Aldehyd oxydiert. Das bei den Versuchen erhaltene gelbliche, flüssige Öl spricht für Ölsäure. Ob hier reine Ölsäure oder ein Säuregemisch von Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Stearinsäure, also Säuregemische verschiedener Hydrierungsstufen vorliegen, konnte wegen zu geringer Materialmengen vorerst noch nicht festgestellt werden und wird einer späteren Untersuchung vorbehalten. Mit Octatrienal (M. G. 122) liegen die Äquivalentwerte bei 244, 267, d. h. hier sind 2 Moleküle kondensiert und dann die Aldehydgruppe zur Säuregruppe oxydiert worden. Das Reaktionsprodukt war vaselineartig. Ob es sich hier um Hexadecensäure oder Palmitinsäure, schließlich um ein Säuregemisch handelt, steht ebenfalls noch nicht fest. Versuche mit den wichtigen Zwischenstufen Crotonaldehyd, Acetaldol lieferten das Ergebnis, daß hier jeweils 4 Moleküle zum Fettsäuremolekül verknüpft werden.

Die Aldehyde wurden, soweit sie nicht in Wasser löslich waren, in Form ihrer löslichen Bisulfitverbindungen in die Versuche eingesetzt. Die beiden äußerst zersetzbaren Aldehyde Hexadienal und Octatrienal waren außerdem in Form dieser weitgehend beständigen Bisulfitverbindungen leicht zu handhaben. Auf den Bisulfitverbindungen wuchs der Pilz bei Aldehydkonzentrationen von 0,1% und darunter ausgezeichnet. Zu den Versuchen wurden die Substratlösungen vor der Impfung mit Pilzmaterial mit Hefewasser vermischt. Um eindeutige Versuchswerte zu erzielen, wurden gleichzeitig mit dem Hauptversuch folgende Kontrollversuche angesetzt:

1. Gemisch von Aldehydbisulfitlösung mit Hefewasser ohne Pilz;
 2. reine Aldehydbisulfitlösung ohne Pilz;
 3. reines Hefewasser mit Pilz beimpft.

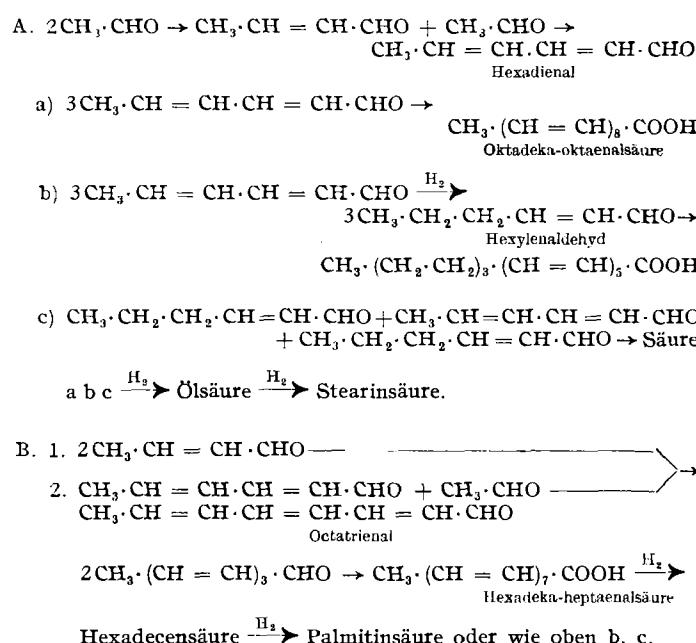
Die Aufarbeitung wurde nach 5—7 Tagen vorgenommen. Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur (15—23°) durchgeführt.

Die Kondensation der Aldehyde wird wahrscheinlich durch das Ferment Aldolase katalysiert.

Die unter Wasserabspaltung gebildeten höheren Polyen-aldehyde gehen dann entweder durch Autoxydation oder durch Dehydrierung mit Hilfe des Aldehydrasesystems²⁸⁾ in die Fettsäuren über.

Nach *R. Kuhn, Ch. Grundmann u. H. Trischmann*²⁹⁾ sind durchdehydierte Fettsäuren intensiv gefärbt. Da aber bei unseren Versuchen gelblich-weiße oder gelbliche Reaktionsprodukte entstanden, sind die kondensierten ungesättigten Aldehyde hydriert worden. Ob die höheren ungesättigten Aldehyde schon vor der Kondensation teilweise hydriert werden, z. B. Hexadienal zu Hexylenaldehyd, oder ob die Hydrierung sofort nach der Bildung der höheren Polyyenaldehyde bzw. Polyensäuren einsetzt, diese Frage haben wir noch zu klären. Der für die Hydrierung erforderliche Wasserstoff dürfte durch Abbau von Reservestoffen des Pilzes zur Verfügung gestellt werden. Die Hydrierung der Äthylenbindungen wird wahrscheinlich durch das von *F. G. Fischer u. H. Eysenbach*³⁰⁾ aufgefundene Äthylenhydrase-System vollzogen.

Auf Grund unserer Versuchsergebnisse läßt sich folgender Reaktionsmechanismus der Fettsäurebildung aufstellen:



Aus dem Schema geht hervor, daß der biologische Aufbau der Fettsäuren von Acetaldehyd ausgeht und dieser in weiterer Reaktion zu Polyyenaldehyden mit gerader C-Atom-Zahl kondensiert wird. Von der Art, wie die verschiedenen durchlaufenden Kondensationszwischenstufen weiter verknüpft werden, hängt es ab, welche Fettsäuren bzw. Fettsäuregemische letzten Endes aus diesen Prozessen hervorgehen. Die Fette (Glyceride) selbst erhielten wir neben freier Fettsäure z. B. aus Glycerin und Brenztraubensäure, Glycerin und Oktatrienial.

Die äußeren Einflüsse auf das Gleichgewicht im System Glycerin—Fettsäure—Fett—Wasser haben wir im einzelnen noch nicht näher untersucht. Die Synthese der Glyceride aus Glycerin und Fettsäuren wird durch Lipasen zustande gebracht, die auch für die Hydrolyse der gebildeten Glyceride verantwortlich sind. Es ist ohne weiteres klar, daß die Gleichgewichtslage von den relativen Mengen der vier an der Reaktion beteiligten Stoffe abhängt und sich bei Vergrößerung der Menge eines der reagierenden Stoffe in der Richtung zur anderen Seite der Gleichung verschiebt. Glycerinüberschuß führt deshalb zu gesteigerter Synthese, Wasserüberschuß zu Hydrolyse. Durch unsere Versuche ist der Mechanismus der Synthese von Fettsäuren und Fett weitestgehend geklärt worden.

Eingeig. 25. Juli 1940 [A. 89].

²⁸⁾ L. Reichel u. Mitarb., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **203**, 178 [1931], **224**, 176 [1934], **238**, 145 [1935], **237**, 214 [1935], **260**, 135 [1939]; Liebigs Ann. Chem. **536**, 164 [1938].

²⁹) Ebenda 248, 4 (1937).

⁵⁰) Liebigs Ann. Chem. **529**, I [1937].