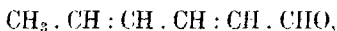


57. Hugo Haehn und Walter Kinttof: Über den chemischen Mechanismus bei der Fettbildung in der lebenden Zelle. (Vorläufige Mitteilung.)

(Eingegangen am 23. November 1922.)

In einer früheren Arbeit »Über die Möglichkeit der Fettsynthese durch Pilz- bzw. Hefe-Enzyme« hatte der eine¹⁾ von uns die Ansicht geäußert, daß die Umwandlung der Kohlehydrate zu Fetten in der lebenden Zelle über den Acetaldehyd gehe und dieser das geeignete Zwischenglied sei, mit dessen Hilfe nach dem Schema der Aldol-Kondensation die nötigen Fettsäuren aufzubauen wären. P. Lindner hatte nämlich die merkwürdige Beobachtung gemacht, daß der Hefepilz *Endomyces vernalis* durch Äthylalkohol verfettet werden kann. Da man jedoch vom chemischen Standpunkte aus eine Umwandlung des Alkohols zu Fett nicht ohne weiteres formulieren kann, so vermutete der eine von uns im Oxydationsprodukt des Alkohols, im Acetaldehyd, den Elementarbaustein der Fette²⁾. Als Stütze für diese Ansicht war damals versucht worden, den Acetaldehyd an den oben erwähnten *Endomyces vernalis* zwecks Fettbildung zu verfüttern, was auch einwandfrei gelungen war. Der fettfreie, ausgebildete Hefepilz gab in der Tat, nachdem die ursprüngliche Nährlösung durch eine Acetaldehyd-Lösung ersetzt worden war, reichliche Mengen Fett. (9% Triolein auf Pilztrockensubstanz ber.) Es war dann in dieser Arbeit ausgeführt worden, daß sich aus dem Acetaldehyd zunächst Aldol und daraus der γ, ϵ -Dioxy-*n*-hexylaldehyd bilden könne, bzw. dessen entsprechender ungesättigter Vertreter, der Aldehyd der Sorbinsäure,



der durch Oxydation die Sorbinsäure und diese wieder durch Reduktion die Capronsäure liefern würde. Der sechsgliedrige Aldehyd wäre nun das gegebene Ausgangsmaterial für die Synthesen der höheren Fettsäuren, denn 3 Mol. untereinander aldolisiert liefern das Kohlenstoffskelett der Stearin- und Ölsäure; 2 Mol. Hexylaldehyd und 1 Mol. Aldol könnten zur Palmitinsäure führen. Daß derartige kompliziert aufgebaute Aldehyde Zellstoffwechselprodukte sein können, das beweisen die Befunde von Th. Curtius und H. Franzen³⁾, die aus den Blättern der Eiche z. B. den α, β -Hexylenaldehyd, Capronaldehyd und höhere ungesättigte Aldehyde isolieren konnten. In einer seiner letzten Abhandlungen über diesen Gegenstand spricht Franzen⁴⁾ direkt diese Stoffe als Zwischenglieder bei der Fettsynthese an. Diese höheren Aldole könnten durch Wasserabspaltung zunächst ungesättigte Verbindungen geben, und da in unserem Falle der nach dem Neubergschen Schema der alkoholischen Gärung frei werdende Wasserstoff nicht den Acetaldehyd zu Alkohol zu reduzieren braucht, so ist er disponibel zur Absättigung der Doppelbindungen der entstehenden Aldehyde bzw. Säuren. Es ist leicht einzusehen, daß man mit Hilfe der ge-

¹⁾ H. Haehn, Z. f. techn. Biologie 9, 217 [1921].

²⁾ Die Lindnerschen Versuche gaben also die Anregung zu dieser Fettbildungstheorie, die ich bereits im Frühjahr 1918 aufgestellt hatte, die aber im Interesse eines Kriegspatentes nicht veröffentlicht werden durfte. Haehn.

³⁾ H. 112, 302. ⁴⁾ H. Franzen, H. 112, 301 [1921].

nannten Bausteine zu den verschiedenen Vertretern der Fettsäurereihe mit gerader Kohlenstoffzahl, also solchen Stoffen, die hauptsächlich in der Natur vorkommen, gelangen kann, worauf auch schon v. Euler¹⁾ in seiner Pflanzenchemie hingewiesen hat. Ebenso vermuten C. Neuberg und J. Hirsch²⁾ im Acetaldehyd und der Brenztraubensäure ein Baumaterial für Leibessubstanzen (z. B. Fett).

Unsere Ansicht über den Fettbildungsprozeß wird durch folgendes Formelschema ausgedrückt:

Glucose³⁾ \rightarrow Brenztraubensäure \rightarrow Acetaldehyd \rightarrow Aldol \rightarrow Glycerinester.

Von einer genauen Formulierung, auch einiger einfachen Reaktionsgleichungen, muß zurzeit Abstand genommen werden, da die quantitativen Versuche noch nicht abgeschlossen sind.

Zur experimentellen Lösung unserer Aufgabe wären zunächst zwei Hauptfragen von besonderer Bedeutung: 1. sind die genannten Zwischenglieder zellfremde Materialien, können sie von der Zelle gut assimiliert werden? 2. sind die angegebenen Zwischenprodukte durch Abfangeverfahren nachzuweisen?

1. Es ist uns nun in der Tat gelungen, diese drei Zwischenglieder vom *Endomyces vernalis* glatt assimilieren zu lassen, und zwar wird sowohl aus der Brenztraubensäure, sowie aus dem Acetaldehyd, als auch aus dem Aldol Fett gebildet. Es wurden auf einer normalen Nährlösung die Pilze gezüchtet, und als das Mycel ausgebildet war, wurde die Nährlösung durch eine reine durch sek. Kaliumphosphat auf $p_H = 6.8$ gepufferte Brenztraubensäure- bzw. Acetaldehyd- bzw. Aldol-Lösung ersetzt, worauf nach 24 Stdn. schon das erste Fett in der Zelle erschien. Die Fig. 1 zeigt uns den *Endomyces vernalis* in 1000-facher Vergrößerung⁴⁾. Wir sehen »leere« Zellen. Der Pilz war auf Bierwürze gezüchtet worden und nach Ausbildung des Mycels nur mit Wasser weiter gefüttert worden. Fettbildung ist nicht eingetreten. Fig. 2 gibt uns die normale Verfettung des *Endomyces* auf Bierwürze (Maltose als Baustoff für die Fette) wieder. Wir beobachten überall Fettröpfchen. Bei der Brenztraubensäure-, bzw. Acetaldehyd- oder Aldol-Fütterung erhalten wir dasselbe Bild wie in Fig. 2.

Vom enzymatischen Standpunkte aus zerlegen wir den Fettbildungsprozeß in zwei Phasen. Im ersten wird der Zucker wahrscheinlich mit Hilfe von Zymasen bis zum Acetaldehyd über Brenztraubensäure, wahrscheinlich nach dem Neubergschen Schema der alkoholischen Gärung abgebaut. Wir sind dabei, diese Annahme nachzuprüfen. Bisher konnten reichliche Mengen Kohlensäure nachgewiesen werden, während Alkohol nicht aufzufinden war. Diese Tatsache würde für unsere Theorie sprechen, wenn man das Auftreten dieses Gases nicht der aeroben Atmung, sondern

¹⁾ Alle diesbezügliche Literatur ist in der zitierten Arbeit d. Verf. angegeben.

²⁾ C. Neuberg und J. Hirsch, Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment, Bio. Z. 115, 282 [1921].

³⁾ Es sei hier nochmal erwähnt, daß im allgemeinen die Zuckerarten das Ausgangsmaterial für die Fettsynthese in der lebenden tierischen und pflanzlichen Zelle sind.

⁴⁾ Die Original-Photographien, deren direkte Wiedergabe sich der hohen Kosten wegen verbot, wurden von Hrn. Prof. P. Lindner aufgenommen. Die wiedergegebenen Zeichnungen entstammen der Feder des Biologen Hrn. M. Glaubitz. Beiden Herren sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

der Wirkung der Carboxylase auf Brenztraubensäure zuschreiben will. In diesem Falle käme die Hälfte des Zuckers der Fettbildung nicht zugute. Wir hätten dann denselben Verlust an Material wie bei der alkoholischen Gärung. Vielleicht braucht die lebende Zelle diese Carboxylase-Reaktion zur Beschaffung von Energie. Im Fett ist bekanntlich mehr als die doppelte Menge Energie (Verbrennungswärme) aufgespeichert, wie in den Kohlehydraten. Quantitative Versuche zur Klärung dieser Frage sind in Gang. Im zweiten Teil des Prozesses würden dann synthetisierende Enzyme, vielleicht auch eine Carboligase-Art, aus Aldehyd zunächst Aldol bilden und weiter höhere ungesättigte Fettsäuren, die, wie oben erwähnt, durch Reduktion die überflüssigen Doppelbindungen verlieren könnten. Auch Glycerin läßt sich aus den Aldehyd-Kondensationsprodukten formulieren, wie es in der früheren Arbeit angegeben wurde.

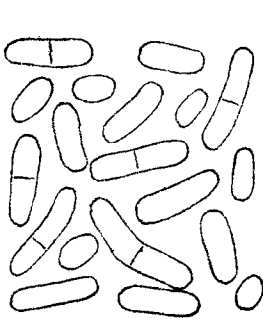


Fig. 1. *Endomyces vernalis*, Eiweiß-Generation, nach 3 Tagen mit Wasser unterschichtet. Zeigt keine Fetttröpfchen. Vergröß. 1000 \times . (Schematische Darstellung.)

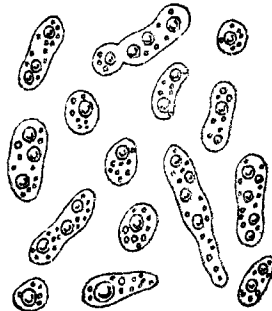


Fig. 2. *Endomyces vernalis*, normale Verfettung bei Zucker-Nahrung. Vergröß. 1000 \times . (Schematische Darstellung.)

Der Verfettungsversuch mit Aldol ist insofern interessant, als man hieraus ersieht, daß das Produkt der ersten Phase des Aufbaues zur vollständigen Fettbildung ausreicht. Man wird hier annehmen müssen, daß ein Teil des Aldols zu Acetaldehyd zurückgespalten wird, der nun mit dem übrig gebliebenen Aldol weiterreagiert. Es folgt hieraus, daß Aldol kein zellfremder Stoff ist, und daß die Zelle aldol-verarbeitende Enzyme besitzt.

Die Versuche wollten anfänglich nicht recht glücken, die Pilze wurden sichtbar krank. Erst dann, als wir die Zwischenprodukte in dem Augenblick mit der ursprünglichen Nährlösung auswechselten, als die Fettenzyme vollständig vorhanden waren, trat glatte Fettbildung ein. Seit dieser Zeit ist kein negativer Versuch mehr beobachtet worden, die Fetttröpfchen-Bildung wurde von Versuch zu Versuch schöner.

Wenn man den Acetaldehyd als Reaktionsprodukt des Acetylens betrachtet, so wäre hier in diesem Fettbildungsprozeß die Synthese eines Fettes direkt aus Kohlenstoff erreicht.

2. Was nun das Abfangen der Zwischenprodukte bei der Fettbildung aus Zucker anbetrifft, so kann mitgeteilt werden, daß es uns bis jetzt geglückt ist, den Acetaldehyd als Zwischenglied mit Hilfe der Sulfit-Methode nachzuweisen. Es wurde beobachtet, daß in solchen Versuchen, bei denen der

Acetaldehyd abgefangen wurde, die Fettbildung recht spärlich eintrat, was ja auch selbstverständlich erscheint. Unsere Ausbeuten an Acetaldehyd entsprechen etwa den von Neuberg gefundenen Zahlen bei Schimmelpilzen. Im experimentellen Teil finden wir die näheren Angaben.

Somit stützen die bisherigen Befunde die Theorie, daß der Acetaldehyd die Brücke zwischen Kohlehydraten und Fetten bei dem Zellstoffwechsel ist. Quantitative Versuche müssen den restlosen Beweis bringen.

Der Nachweis von Fett ist im experimentellen Teil zu finden.

Beschreibung der Versuche.

1. Fettbildung aus Zucker.

Auf einer sterilen Bierwürze-Lösung ($\frac{3}{4}$ l) von einigen Graden Balling, die sich in einer sterilen flachen Magnaliumschale (50×30 cm) befindet, wird eine Reinkultur von *Endomyces vernalis*, eine sog. Eiweiß-Generation, ausgesät. Das Impfmateriale, auf 250 ccm steriler Würze gezüchtet, ist etwa 2—3 Tage alt und zeigt im Mikroskop noch keine Fetttropfchen, sondern nur Protoplasma und Vacuolen (Eiweiß-Generation). Der Pilz wächst am besten bei Zimmertemperatur (etwa 15°) und bei genügender Aussaat so intensiv, daß in der offenen Schale keine Infektion eintritt. Nach 24 Stdn. ist die Flüssigkeit mit einer sehr dünnen, gleichmäßigen Haut bedeckt, die nach weiteren 24—36 Stdn. eine schneeweiße Farbe annimmt. In dieser Zeit beginnt auch eine Kräuselung des Pilzes. Im Mikroskop ist jetzt ein normales Pilzmycel ohne Fett zu beobachten. In den nächsten Tagen beginnt die Fettbildung: es treten zunächst kleine, stark lichtbrechende Tröpfchen auf, die sich dann so sehr vergrößern, daß oft zwei Drittel der Zelle damit angefüllt sind. Färbt man jetzt die Zellen mit Nilblau, so nehmen die Fetttropfchen einen roten Farbenton an, was durch eine kolloidchemische Reaktion erklärt wird. Ausführliches hierüber an anderer Stelle in der nächsten Abhandlung. Auch die Fettreaktion nach Zettnow mit Dimethyl-*p*-phenylendiamin-Hydrochlorid und α -Naphthol tritt positiv ein: Blaufärbung der Fetttropfen. (Naphtholblau-Bildung.)

2. Quantitative Bestimmung des Fettes.

Ist überall im Pilz Fett reichlich vorhanden, so wird er geerntet und bei 100° getrocknet. Man bringt dann in einen eisernen Tiegel etwa 3 g fein gemahlene Pilzsubstanz, 5—10 ccm Wasser, etwa 20—25 g Stangen-Ätzkali und schmilzt vorsichtig, damit die Masse nicht überschäumt. Die Farbe der Schmelze wird allmählich heller und schlägt von tiefbraun zu olivgrau um. Jetzt ist der Aufschluß beendet, worauf die erkaltete Masse in 100—150 ccm Wasser gelöst wird. Die mit Schwefelsäure sauer gemachte Lösung liefert nach der Extraktion mit Petroläther die Fettsäuren, die in Alkohol aufgenommen, titrimetrisch mit alkoholischer Kalilauge bestimmt werden. Man berechnet auf Triolein. Diese Methode ist während der Kriegszeit von F. Stockhausen und Raoul Ericson ausgearbeitet, bisher jedoch noch nicht veröffentlicht worden.

3. Fettbildung aus Brenztraubensäure.

A. Der *Endomyces vernalis* wird wie in 1. angegeben auf Bierwürze in einer Magnaliumschale gezüchtet. Ist die Eiweiß-Generation nach 2—3 Tagen gebildet, so gießt man vorsichtig die Nährlösung ab und unterschichtet

zwecks Waschung mehrmals mit sterilem Wasser. Gibt dieses keine Reaktion mehr mit Fehlingscher Lösung, so unterschichtet man eine mit sek. Natriumphosphat nahezu neutralisierte 1-proz. Brenztraubensäure-Lösung ($p_H = 6.8$) und läßt weiter wachsen. Diese Operationen glücken bei einiger Vorsicht sehr leicht, da das Pilzmycel eine zusammenhängende Haut bildet, die das Bestreben hat, an der Oberfläche zu schwimmen. Der Pilz, der bis jetzt fettfrei war, ist innerhalb 24 Stdn. verfettet.

B. Es gelingt auch, auf andere Weise eine Verfettung mit wäßriger Brenztraubensäure zu erzielen, und zwar so, indem man den Pilz auf einer künstlichen Nährlösung, die Brenztraubensäure anstatt Maltose enthält, heran-züchtet. Von vornherein sei gesagt, daß Versuche mit brenztraubensaurem Ammonium allein, in Konzentrationen von 0.125, 0.25 und 0.5 % angewendet, nur negative Resultate lieferten. Demgegenüber gelang es durch Anwendung eines Puffersystems $CH_3 \cdot CO \cdot COOH + K_2HPO_4$ bei niedriger Konzentration unter gleichzeitiger Beigabe einer Stickstoffquelle ein Wachstum des Pilzes und eine Verfettung innerhalb von 6 Tagen zu erzielen. Die weiter unten angeführte sterile Nährlösung (100 ccm) wurde mit Hilfe einer Impfnadel aus der Agarkultur besät und sich dann bei Zimmertemperatur selbst überlassen. Nach 2—3 Tagen begann die Mycelbildung, worauf allmählich Verfettung eintrat. Daß diese Fettbildung nicht in den der Nährlösung zugefügten Eiweißstoffen ihre Ursache hat, wurde durch zwei entsprechende Kontrollversuche, denen keine Brenztraubensäure zugesetzt war, bewiesen. In diesen wuchs der Pilz ähnlich wie bei Kulturen auf Hefewasser, z. T. an der Oberfläche, z. T. submers. Eine Verfettung war nicht nachzuweisen.

Die für die einzelnen Versuche verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzungen:

Nährlösung	Versuch I	Versuch II	Kontrolle I und II	
Pepton »Witte«	0.6	0.6	0.6	‰
MgSO ₄	0.6	0.6	0.6	‰
K ₂ HPO ₄	2.0	2.0	1.0	‰
CH ₃ · CO · COOH	0.5	0.87	0.0	‰
H-Ionen-Konzentration $p_H =$	6.8	6.0	—	—
Resultat	verfettet	verfettet	nicht verfettet	

4. Fettbildung aus Acetaldehyd bzw. Aldol.

Diese Versuche werden genau so angestellt wie die unter 3A beschriebenen. Man unterschichtet hier zweckmäßig eine 1-proz. Lösung von reinem Acetaldehyd (Kahlbaum) in Wasser und gibt jeden Tag neuen Acetaldehyd hinzu. Auf diese Art reichert sich die Pilzzelle mit einzelnen, isoliert liegenden Fetttropfchen an, die von Tag zu Tag an Umfang zunehmen. Benutzt man höhere Konzentrationen, so leidet offenbar das Protoplasma, man beobachtet im mikroskopischen Bilde eine Körnelung desselben, eine Erscheinung, die auch oft Brauereihefen unter bestimmten Wachstumsbedingungen geben. In solchen Fällen treten die Fetttropfchen sehr bald in Erscheinung, wenn man die Organismen nach P. Lindner mit warmer Salzsäure auf dem Objektträger mit der Sparflamme behandelt. Es ist selbstverständlich, daß eine Fettbildung durch Unterschichtung eines ein-

zelenen Stoffes wie hier nur dann erfolgen kann, wenn die Zelle sämtliche Enzyme ausgebildet hat. Diesen Zeitpunkt abzapassen, ist Sache einer geringen Übung. Das gebildete Fett aus Acetaldehyd gibt dieselbe Nilblau-Reaktion und Zettnowsche Probe, wie das aus Maltose gewonnene. Durch Aufschluß der Pilzzellen mit Hilfe von schmelzendem Alkali wurden die Fettsäuren nach 2. quantitativ bestimmt. Kontrollversuche, die mit sterilem Leitungswasser unterschichtet wurden, zeigten im Mikroskop kein Fett. Die Analyse dagegen verriet die Anwesenheit weniger Prozente.

			I.	II.
a) Hauptversuch	Pilz mit Acetaldehyd gefüttert	11 %	Triolein	15 % Triolein
b) Kontrollversuch:	» Wasser unterschichtet	2 %	»	4 % »

Die Aldolversuche verliefen in derselben Weise.

5. Das Abfangen des Acetaldehydes.

Um den Acetaldehyd als Zwischenglied bei der Umsetzung von Zucker in Fett festzulegen, bedienten wir uns des Sulfid-Abfangverfahrens von C. Neuberg¹⁾. Dieses konnte auf das Leben des *Endomyces* so eingestellt werden, daß ein genügendes Wachstum desselben erreicht wurde.

Die Nährlösung war folgendermaßen zusammengesetzt:

Nährlösung	I	II
Rohrzucker	12.00 %	10.80 %
Pepton »Witte«	0.50 »	0.50 »
MgSO ₄	0.03 »	0.03 »
CaCl ₂	0.02 »	0.02 »
FeSO ₄	0.001 »	0.001 »
MnSO ₄	0.001 »	0.001 »
NaCl	0.002 »	0.002 »
KH ₂ PO ₄	0.05 »	0.05 »
K ₂ HPO ₄	0.05 »	0.05 »
Na ₂ SO ₃	1.00 »	0.75 »
CaCO ₃	ca. 0.75 »	0.75 »

ihr Volumen betrug 500 ccm.

In sterilem Zustande beimpft, fing der ausgesäte *Endomyces vernalis* sehr bald zu wachsen an. Da jedoch derselbe ein Oberflächenpilz ist, der zum Leben reichlich Luft benötigt, so waren von vornherein nicht derartige Aldehyd-Ausbeuten zu erwarten, wie sie C. Neuberg bei der alkoholischen Gärung des Zuckers erhielt. Immerhin versuchten wir, durch Umschütteln, das durchschnittlich alle 4—5 Tage wiederholt wurde, eine möglichst große Menge Pilzmaterial zu schaffen und dadurch die Aldehyd-Ausbeute zu begünstigen. Trotzdem aber überschritt die Menge des abgefangenen Aldehyds nicht die von C. Neuberg bei Schimmelpilzen gefundenen Prozentzahlen.

So ergab beispielsweise ein Versuch mit Nährlösung I 0.08 g Aldehyd, d. s. 0.4 % des verbrauchten Zuckers und gleich 4.6 % des schätzungsweise gebildeten Fettes. Versuchsdauer: 25 Tage. Das mikroskopische Bild zeigte verhältnismäßig wenig Fett an. Demgegenüber erhielten wir aus einem zweiten Versuch mit Nährlösung II nur 0.04 g Aldehyd. Versuchsdauer: 20 Tage. Das mikroskopische Bild zeigte eine nor-

¹⁾ C. Neuberg und C. Cohen, Über die Bildung von Acetaldehyd und die Verwirklichung der 2. Vergärungsform. Bio. Z. 122, 204 [1921].

male Verfettung an. In bezug auf die Fettbildung sind also die Aldehyd-Ausbeuten trotz ihrer geringen Werte doch günstig, denn sie zeigen sehr deutlich, daß der Acetaldehyd bei der Fettbildung aus Zucker eine wichtige Rolle spielt.

Die Aufarbeitung der Nährlösung geschah nach Neubergs Vorschrift, der qualitative Nachweis des Acetaldehyds nach Rimini¹⁾, die quantitative Bestimmung nach dem Verfahren von Ripper²⁾.

Möglich, aber noch nicht erwiesen ist, daß der durch Natriumsulfit abgefangene Acetaldehyd durch den *Endomyces* wieder verbraucht wird, und daß infolgedessen eine erheblich größere Aldehyd-Ausbeute sich nicht erreichen läßt.

Der Gedanke, daß die gefundenen Aldehyd-Mengen einer nebenher laufenden alkoholischen Gärung des *Endomyces* entstammen könnten, ist zunächst nicht ohne weiteres abzuweisen. Jedoch haben die Untersuchungen gelehrt, daß durch unsern Pilz kein Alkohol gebildet wird.

Es gelangten 3 Nährlösungen, bestehend aus gehopfter Würze (10—12° Balling) + 39/00 Hefe-Extrakt, auf denen der Pilz a) 10 Tage, b) 17 Tage und c) 76 Tage lang gewachsen war, zur Untersuchung auf Alkohol. Je 200 ccm Nährlösung wurden destilliert, je 100 ccm Destillat aufgefangen und in letzterem die Alkohol-Bestimmung versucht.

Versuch	Dauer	Alkoholgehalt mittels Spindel bestimmt	Jodoformprobe	Aldehydprobe	Fettbildung
a	10 Tage	0.0 %	negativ	sehr schwach	sehr stark
b	17 „	0.3 %	undeutlich	negativ	„ „
c	76 „	0.1 %	„	„	„ „

Es war also kein Alkohol deutlich nachweisbar. Wenn nun auch festgestellt ist, daß derselbe vom *Endomyces* assimiliert werden kann, so hätte man doch in einem der Versuche wenigstens etwas Alkohol finden müssen.

Berlin, Institut für Gärungsgewerbe.

¹⁾ Rimini, Reaktion auf Acetaldehyd, Beilstein, Erg.-Bd. I.

²⁾ Ripper, Quantitative Acetaldehyd-Bestimmung. Bio. Z. 26, 207 [1910].