

Fettanreicherung in *Rhodotorula gracilis*.

Von
Marta Blinc und B. Hočevár.

Aus dem Chemischen Institut der Akademie der Wissenschaften in Lubljana.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 22. Juli 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 8. Okt. 1953.)

Rhodotorula gracilis wurde auf Invertzuckerlösungen unter Verwendung verschiedener Stickstoffquellen und teilweise in Gegenwart von Zinkionen gezogen. Die besten Resultate ergaben sich mit Asparaginsäure, welche sowohl in bezug auf den Fettgehalt der Hefe als auch in bezug auf den Fettkoeffizienten und die Raumaussnutzung alle anderen stickstoffhaltigen Nährstoffe weit übertrifft. Es wurden die höchsten bisher mitgeteilten Fettausbeuten von über 74% Fettgehalt in der Hefe und ein Fettkoeffizient von 21 erzielt.

Das Bestreben, den Metabolismus von Mikroorganismen zur Fettgewinnung auszuwerten, geht bekanntlich auf den ersten Weltkrieg zurück. Lindner hat *Endomices vernalis* auszuwerten versucht, *L. von Portheim* und *M. Samec* zogen *Mucor stolonifer* auf Sulfitablauge. Wegen der technischen Schwierigkeiten und dem Fehlen einer Rentabilität hat das Problem des Mikrobenfettes nur langsame Fortschritte gemacht; im zweiten Weltkrieg haben schwedische Forscher wesentliche und entscheidende Erfolge erzielt¹.

H. Lundin gelang es, durch passende Kulturführung in *Rhodotorula gracilis* einen Fettgehalt von 60 bis 63% und 13% Eiweiß mit einem Fettkoeffizienten bis zu 18 zu erzielen².

Wir haben die Versuche von *Lundin* wieder aufgenommen, einerseits um die Reproduzierbarkeit bei fortlaufendem Kultivieren zu überprüfen,

¹ *L. Enebo, L. G. Anderson und H. Lundin*, Arch. Biochemistry **11**, 383 (1946).

² Literaturübersicht siehe bei *H. Lundin*, Jahrb. Hochschule f. Bodenkultur **2**, 410 (1948). — *H. Bernhauer*, Fette u. Seifen **52**, 203 (1950). — *R. Kunze*, Mitt. Versuchsanstalt f. d. Gärungsgewerbe Nr. 3/4 (1950).

andererseits um eine eventuelle weitere Steigerung des Fettgehaltes dieser Hefe zu erzwingen.

Für unsere Versuche diente uns *Rhodotorula gracilis*, welche wir aus dem Institut für Lebensmittelchemie an der Kungl. tekniska Hogskolan in Stockholm erhalten haben. Für das Überlassen der Reinkultur sind wir den Herren *H. Lundin* und *E. Torquist* zu großem Danke verpflichtet.

Als Strichkultur auf Bierwürze-Agar³ gezogen, hat die Hefe bei zweiwöchentlichem Überimpfen innerhalb von drei Jahren ihre volle Virulenz beibehalten. Die Kulturen haben die charakteristische rote Farbe, zeigen ihren schönen Fettglanz, die Zellen sind oval verdickt und enthalten reichlich Fetttröpfchen.

Die Stammkulturen hielten wir in Eprouvetten auf einem der genannten Nährsubstrate. Der Inhalt je einer Epruvette wurde mit ausgekochtem Leitungswasser in einem 500-ccm-*Erlenmeyer*-Kolben mit 100 ccm der jeweils gewählten Nährflüssigkeit gespült und 40 bis 60 Stdn. bei 22 bis 26° C geschüttelt. Bei gut geführten Versuchen sollen in dieser Zeit mindestens 60% des verfügbaren Zuckers verbraucht worden sein. Die gebildete dicke Suspension diente als Impfmasse für die eigentliche Zucht. Je 30 ccm davon übertrugen wir in 1000-ccm-Kolben mit je 300 ccm Nährlösung. Die verschlossenen Gefäße wurden in einem Raume von 22 bis 26° auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Diese wurde von uns gleichzeitig und unabhängig von *Bernhauer*⁴ durchgebildet. Sie faßte je nach der Kolbengröße 15 oder 30 Gefäße und konnte im Thermostaten oder im freien Raum verwendet werden. Bei der erwähnten Flüssigkeitsmenge war zur Erzielung der besten Fettwerte trotz des Schüttelns eine Belüftung notwendig. Zu diesem Behufe waren die Kolben mit einem Stopfen verschlossen, durch welchen ein Rohr bis knapp zur Oberfläche der Flüssigkeit (nicht in diese), ein zweites bis unter den Stopfen reichte. Durch das erste Rohr wurde filtrierte Luft eingeblasen. Den Verlauf der Fermentation verfolgten wir durch makroskopische und mikroskopische Beobachtung, durch Messung des Trübungsgrades, Bestimmung des pH und des Zuckers.

Als günstigste Fermentierungszeit fanden wir 70 Stdn.⁵ In dieser Zeit waren mehr als 80% Zucker verbraucht. Als organisches Substrat diente uns Invertzucker in der Konzentration 4 bis 6%, welchen wir selbst bereitet haben. Variiert haben wir die Zusammensetzung der anorganischen Nährstoffe. Führend waren die Erkenntnisse früherer Forscher, daß die Anreicherung von Fett an ein niedriges Verhältnis von N : C gebunden ist. Wir hielten es in den Grenzen 1 : 75 bis 1 : 100. Wir gingen von der *Lundinschen* Kombination

³ Zusammensetzung des Nährsubstrats: 1. 2 g Agar, 0,1 g Ammonsulfat, 0,1 g sek. Kaliumphosphat, 5 ccm Bierwürze, 1 bis 2 g Glukose, 100 g Wasser. 2. 2 g Agar, 0,1 g Asparagin, 0,2 g sek. Kaliumphosphat, 5 ccm Bierwürze, 2 g Glukose, 100 g Wasser. pH = 5 bis 7 (mit NaOH eingestellt).

⁴ *K. Bernhauer* und *J. Rauch*, *Biochem. Z.* **320**, 36 (1950).

⁵ *H. Lundin*, *J. Institute Brewing* **16**, Nr. 6 (1950).

Invertzucker	40—60 g/l
Ammonsulfat	0,5—1 g/l
KH_2PO_4	0,5—1 g/l
Magnesiumsulfat · 7 H_2O ..	1 g/l
Natriumchlorid	0,5 g/l
Kalziumchlorid · 6 H_2O ...	0,5 l
Ferrichlorid · 6 H_2O	0,005 l
Bierwürze	25 cem/l
pH 4,5	

aus. Da nach unseren früheren Erfahrungen die Anwesenheit kleiner Mengen von Zinkionen für die Fettbildung günstig sind, setzten wir in der Mehrzahl der Versuche auch Zinksulfat in der Menge der Nährlösung zu. In dieser änderten wir die Stickstoffquelle.

Es ist bekannt, daß während des Wachstums der *Rhodotorula gracilis* das Substrat, welches Ammonsulfat enthält, sauer wird. Gegen Ende der Gärung erreicht die Kulturflüssigkeit einen Säuerungsgrad von $\text{pH} = 2,2$.

Organische Stickstoffverbindungen, wie z. B. Harnstoff, Harnsäure oder Asparagin, wie sie unter anderem von *D. Ekström* und *F. Sandgren*⁶ verwendet worden sind, wirken mehr oder weniger automatisch neutralisierend. In Gegenwart von Harnstoff sinkt das pH merklich, Harnsäure und Asparagin aber halten das anfangs eingestellte pH während der ganzen Kulturdauer fast unverändert fest.

Ganz eigens verhält sich Asparaginsäure. Bei sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen steigt das pH während des Wachstums unserer Hefe stetig an. Wenn die Hauptmenge des Zuckers verbraucht ist, erreicht es den Wert 7,2. Man ist dadurch zwar aus dem Bereich der optimalen Säuerung herausgekommen, doch scheint gerade das allmähliche Nachlassen der optimalen Säuerung einen Anlaß für eine weitere Fettablagerung zu bilden. Auf diese Weise erhielten wir einen Höchstgehalt an Fett von 76% der Trockensubstanz, neben 13% Eiweiß. Bei einer Ausbeute von 29,2 g Hefesubstanz je 100 g Zucker entspricht dies einem Fettkoeffizienten von 22 und einem Eiweißkoeffizienten von 3,8. So weit uns bekannt ist, sind dies die höchsten bisher beobachteten Fettausbeuten.

Experimenteller Teil.

Den *Invertzucker* bereiteten wir nach der üblichen Methode. Eine 50%ige Lösung von Saccharose wurde durch Zusatz von 25%iger Schwefelsäure auf ein $\text{pH} = 2$ gebracht, 2 Stdn. auf 80° erhitzt, das Reaktionsgemisch mit Kalkmilch neutralisiert ($\text{pH} = 6$) und das Calciumsulfat abdekantiert.

⁶ *D. Ekström* und *F. Sandgren*, European Brewery Convention Congress 1951, S. 178. — *F. Sandgren*, *D. Ekström* und *N. Nielsen*, Acta Chem. Scand. 4, 1311 (1950).

Tabelle I. Schüttelkulturen.
a) Ohne Durchlüftung, b) mit Durchlüftung.

Sticksstoffquelle	% Fettgehalt	% Eiweiß	Fettkoeffizient	Hefekoeffizient	% des ver- brauchten Zuckers	g Fett pro Liter Nährstoff	Hefe pro Liter Nährstoff
(NH ₄) ₂ SO ₄	a) 45,42—48,18 46,80	—	8,41—16,11 12,26	18,17—33,73 25,95	62,53—95,24 78,88	2,03—5,37 3,70	6,80—11,16 9,02
	b) 47,75—55,86 51,81	—	16,11—14,88 15,25	33,73—25,79 30,76	54,80—75,07 64,44	3,33—4,35 3,84	6,80—7,80 7,35
Urea	a) 61,78—66,65 64,21	18,46—13,50 15,98	15,66—16,05 15,85	25,35—24,08 24,71	64,56—68,25 66,40	5,96—6,23 6,09	9,64—9,68 9,66
	b) 64,59—69,13 66,86	13,72—14,46 14,09	16,94—15,49 16,21	26,23—22,40 24,31	75,61—67,71 71,66	7,72—4,92 6,32	11,96—7,14 9,55
Harnsäure	a) 60,04—68,66 64,35	16,75—13,59 15,17	10,25—13,63 11,94	17,08—19,85 18,46	70,90—87,58 79,24	4,06—6,18 5,12	6,76—9,00 7,88
	b) 65,78—68,08 66,92	16,19—12,86 14,52	17,26—14,81 16,03	26,25—21,75 24,00	63,38—94,87 79,12	6,36—7,30 6,83	9,68—11,08 10,38
Asparagin	a) 55,74—67,31 61,52	15,42—13,82 14,62	11,86—16,13 13,99	21,28—23,95 22,61	60,81—85,27 59,54	4,42—5,67 5,04	7,93—8,42 7,67
	b) 71,00—73,14 72,07	15,80—12,11 13,95	20,06—16,83 18,44	26,83—27,88 27,35	78,39—82,41 80,40	7,80—7,20 7,50	11,00—12,40 11,70
Asparaginsäure	a) 60,15—70,19 65,17	16,10—11,21 13,65	17,78—13,86 15,82	29,55—19,85 24,70	64,48—75,31 69,89	5,54—6,00 5,77	9,21—8,52 8,86
	b) 72,77—76,03 74,40	14,61—13,06 13,80	19,61—22,22 20,91	27,11—29,22 28,16	78,78—85,11 81,94	8,68—10,34 9,46	11,86—13,61 12,73

Die *Zuckerbestimmung* führten wir nach *Bertrand*⁷ durch, die *Stickstoffbestimmung* nach der Semimikromethode von *Kjeldahl*. Die *Azidität* maßen wir potentiometrisch mit einer Glaselektrode.

Für die *Erfassung des ganzen Fettes* ist es Bedingung, daß das Zellmaterial restlos zerstört wird.

Zu diesem Behufe zerkleinerten wir portionenweise je 2 g getrocknete Hefe (3 bis 5% Feuchtigkeit) unter Zusatz der gleichen Menge Quarzsand zu einem feinen Pulver, erhitzen sie mit 25 ccm 10%iger Salzsäure in einer Porzellanschale unter stetem Umrühren $\frac{1}{2}$ Std. bis zum leichten Sieden. Durch Variation der Säurekonzentration in den Grenzen von 5 bis 15% und der Hydrolysendauer von $\frac{1}{2}$ bis 2 Stdn. haben wir uns überzeugt, daß die angegebenen Bedingungen die besten Fettresultate geben. Das hydrolysierte Material wurde filtriert, der Filtrückstand, welcher unter anderem auch das Fett enthält, wurde bis zum Verschwinden der sauren Reaktion (Methylorange) mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen. Über die Masse, welche mit einer Infrarot-Glühlampe bestrahlt wurde, wurde mit einem kleinen Ventilator Luft geblasen. Schließlich wurde im Vakuum-Trockenschrank bei 60° getrocknet und im *Soxhlet*-Apparat mit über Calciumchlorid getrocknetem Äther extrahiert.

Die *nephelometrische Kontrolle* der Hefebildung ist ein bequemer Behelf, den Gang der Kultur zu verfolgen. Im *Lange*-Kolorimeter, in welchem wir die jeweils zu untersuchende Kulturflüssigkeit mit der Ausgangslösung verglichen, erhielten wir Resultate, wie sie aus Abb. 1 zu ersehen sind.

Einen Überblick über die Resultate gibt die Tabelle 1. In dieser bedeuten die kleiner gedruckten Zahlen die Niedrigst- und Höchstwerte, die anderen Zahlen die Mittelwerte. Man sieht das starke Ansteigen des Fettgehaltes und des Fettkoeffizienten bei Verwendung des Asparagins und besonders der Asparaginsäure. Auch die Raumausnutzung ist bei Verwendung der Asparaginsäure bei weitem die beste.

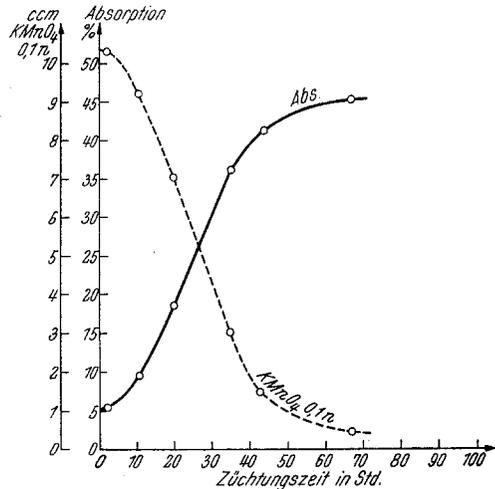


Abb. 1. Trübungsgrad und Zuckergehalt während des Wachstums der *Rhodotorula*.

⁷ *Berl-Lunge*, Chemisch-technische Untersuchungsmethoden, Bd. V, 1934, S. 27.