

Mikrobiologische Eiweißgewinnung aus Kohlenwasserstoffen*

Von A. FIECHTER

Mikrobiologisches Institut, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich

Summary

Originally carbohydrates were used as carbon source for the biological protein synthesis. In western countries this possibility of foodstuff production is of little economical importance.

Recently the protein production from hydrocarbons with yeast and bacteria has become increasingly important. The biological deparaffination results not only in a reduction of the melting point in kerosene, fuel oil and diesel oil, but also supplies at the same time protein valuable for the physiology of nutrition. Apart from data on the characteristics of the growth of yeast in hydrocarbons three examples are quoted (chain length, solubility and constitution) which cause substrate specificity effects. Very high yields (up to 100%) can be obtained on *n*-alkanes. The O₂ consumption is about 3 times that of hydrocarbons. The degradation normally occurs starting from the one end of the carbon chain (monoterminal attack). Biterminal oxidation is however possible; the resulting dicarbonic acids are subjected to the beta attack as with the degradation of fatty acids. Cells from hydrocarbons do not in principle differ from organisms from carbohydrates, but the content of protein and lipids alter according to substrate and O₂ supply.

In the last chapter the three technological problems of cultivation, separation and improvement are treated. The cultivation aspires above all to an improvement of efficiency. The complete separation of the unused hydrocarbons requires a great display, as these substances are located internally and externally of the cells. The improvement finally, aims at the direct utilisation of this protein also for human requirements. Beside the protein synthesis there are tendencies today to produce amino acids or other products from pure hydrocarbons.

The microbiological utilisation of the hydrocarbons will become increasingly important in future.

1. Einleitung

Die Gewinnung von Eiweiß durch Mikroorganismen ist nicht neu, und in Mangelzeiten haben mikrobiologische Verfahren zur Verwertung von Abfallprodukten (Sulfitablaugen, Melasse) jeweils zunehmende Bedeutung erlangt.

Der unter außergewöhnlichen Verhältnissen stark steigende Bedarf an Eiweiß hat sogar zur Erschließung neuer Kohlenhydratquellen geführt, wie dies bei der Herstellung von Holzzuckerwürze durch Hydrolyse beispielsweise der Fall war. Dabei wurde die typische Eigenschaft der Mikroorganismen technisch ausgenutzt, unter geeigneten Bedingungen rascher als alle andern Lebewesen wachsen zu können. Tabelle 1 enthält eine Zusammenstellung solcher Wachstumsgeschwindigkeiten von einigen für die tierische oder menschliche Ernäh-

rung wichtiger Lebewesen. Als Verdopplungszeit gilt jene Zeitspanne, während welcher die Biomasse auf den zweifachen Wert ansteigt.

Tabelle 1. Verdopplungszeiten einiger wichtiger Organismen (nach AIBA, HUMPHREY and MILLIS¹)

Organismus	Verdopplungszeit
Hefen und Bakterien	20–120 Minuten
Komplexe Mikroorganismen wie Algen	2–48 Stunden
Gras	1–2 Wochen
Küicken	2–4 Wochen
Schwein	4–6 Wochen
Rind	1–2 Monate

Die Syntheseleistung von Mikroorganismen ist nach diesen Angaben rund zwei Zehnerpotenzen größer als beim Rind. Nach CHAMPAGNAT und Mitarbeiter² verläuft Eiweißbildung in Mikroorganismen sogar 2500 mal so schnell. Der Vorteil des raschen Wachstums wird allerdings aufgehoben, wenn die mikrobiologischen Prozesse, wie dies häufig vorkommt, an die Verwendung von verhältnismäßig verdünnten Nährlösungen gebunden sind. Die wirtschaftlich tragbare Relation zwischen Aufwand und Ertrag ist bei der mikrobiologischen Eiweißgewinnung daher nicht ohne weiteres gegeben. Hauptsächlich in den westlichen Ländern kommt den Kohlenhydraten als Rohmaterial für die mikrobiologische Eiweißsynthese in normalen Zeiten geringe Bedeutung zu, wenn von der Futterhefeherstellung aus Sulfitablauge abgesehen wird. Überschüssige Melasse kann auf einfache Art auch direkt als Viehfutter verwendet werden, und die industrielle Holzverzuckerung ist, wie die Erfahrungen in verschiedenen Ländern zeigen, wirtschaftlich nicht tragbar. Der größte Teil der anfallenden Futterhefe entsteht in den westlichen Staaten daher aus Sulfitablauge, die als Abfallprodukt der Cellulosefabrikation ohnehin aufgearbeitet werden muß, bevor sie als Abwasser abgeleitet werden kann.

Die gesamte Welterzeugung an Futterhefe wurde 1964 von BUNKER³ auf rund 4000 Tonnen pro Woche geschätzt. Für die menschliche Ernährung kommt aber der tierischen Eiweißproduktion immer noch die hauptsächlichste Bedeutung zu.

Seit etwa fünfzehn Jahren hat nun die mikrobiologische Eiweißsynthese neuen Auftrieb erhalten. Gestützt auf frühere Beobachtungen (MYOSKI 1895 [zit. in ^{3a}],

* Nach einem Vortrag, gehalten an der Wintertagung des Schweizerischen Chemiker-Verbandes am 4. Februar 1967 in Burgdorf.

JUST und Mitarbeiter 1951⁵, BEERSTECHE⁶, ZOBELL⁷ u. a.), nach denen Mikroorganismen Kohlenwasserstoffe als alleinige C-Quelle zum Wachstum verwenden können, begründeten DAVIS und UPDEGRAFF⁸ 1954 den Vorschlag, mit Mikroorganismen aus Kohlenwasserstoffen Nahrung zu beschaffen. Demzufolge sind in den letzten Jahren die Erdölkonzerne dazu übergegangen, Kohlenwasserstoffdestillate als Rohmaterial zur Proteinsynthese zu verwenden. Damit eröffnen sich für die industrielle Eiweißproduktion neue Perspektiven. Diese neuartigen Synthesemöglichkeiten werden daher in verantwortungsbewußten Kreisen immer erwähnt, wenn die Möglichkeiten zur weltweiten Bekämpfung des Hungers erörtert werden. Auch wenn man zur Kenntnis nehmen muß, daß der heute in vielen Gebieten der Welt herrschende Proteinmangel durch eine bessere Verteilung behoben werden könnte, kommt diesem neuen Zweig der Petrochemie nicht nur für die Eiweißproduktion, sondern auch für die Biosynthese anderer Verbindungen große Bedeutung zu.

Gegenüber den Kohlenhydratverfahren besitzt der Kohlenwasserstoffprozeß zwei Vorzüge:

- a) Hohe Ausbeuten. Hefe liefert 50 bis 60% an trockener Biomasse bezogen auf das Gewicht der abgebauten Kohlenhydrate, jedoch 90 bis 100% im Falle der Paraffinoxydation.
- b) Aus Kohlenwasserstoffgemischen können höhere Alkane mit ungeeignetem Schmelzpunkt durch Mikroorganismen abgebaut werden (biologische Deparaffinierung).

Für die Notwendigkeit der Deparaffinierung bestimmter Destillate nennen NICKERSON und BROWN⁹ drei Beispiele:

- Der Schmelzpunkt von Dieselöl darf im allgemeinen -10°C nicht überschreiten. Durch biologische Deparaffinierung läßt sich eine Reduktion von $+11^{\circ}\text{C}$ auf -25°C erreichen.
- Die in großen Höhen fliegenden Strahlflugzeuge benötigen Kerosen mit Schmelzpunkten unterhalb -50°C . Durch biologische Deparaffinierung eines Destillates mit Siedepunkt zwischen 170 und 200°C wird diese erforderliche Eigenschaft erzeugt.
- Hochsiedende Petrofraktionen können durch biologische Deparaffinierung der Verwendung als Heizöl zugänglich gemacht werden.

Die folgenden Ausführungen werden sich daher mit den biologischen und technischen Aspekten der Proteinsynthese aus Kohlenwasserstoffen befassen und die klassischen C-Quellen unberücksichtigt lassen.

Es ist schon lange bekannt, daß Mikroorganismen Kohlenwasserstoffe als Wachstumssubstrat verwenden können. FUHS¹⁰ zählt über hundert Bakterien-, Pilz- und Actinomycetenarten auf, wobei die Hefen in dieser Zusammenstellung eher im Hintergrunde stehen. Neben andern Erregern vermögen aber Hefen vom Typus der

Futter- (*Candida*) und Bäckerhefen (*Saccharomyces*) höhere Alkane mit guter Ausbeute abzubauen, womit eine leistungsfähige Methode der Deparaffinierung von Erdölfraktionen unter Bildung eines Ernährungsrohstoffes gefunden war.

Es darf daraus geschlossen werden, daß das große Interesse der Petroindustrie an diesen biologischen Prozessen nicht unbedingt wegen der Bekämpfung des Hungers in der Welt geweckt worden ist.

Die biologische Proteinsynthese der Petrochemie vereinigt daher die beiden Vorteile einer erwünschten Deparaffinierung mit der Herstellung eines biologisch wertvollen Eiweißes^{11, 12}. Angesichts der vielgestaltigen biologischen Möglichkeiten sind freilich die Anstrengungen der Petrochemie weit über dieses Stadium hinaus gediehen, und es wird nicht nur mit Hefe großtechnisch aus Alkanen Eiweiß erzeugt (450 000 pounds/Jahr in den Anlagen der BP France in Lavera), sondern aus chemisch reinen Substanzen essentielle und andere Aminosäuren, wie Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure^{12 a, 13}. Sogar Phenol läßt sich durch *Debaryomyces* biologisch abbauen und liefert Zellen mit erhöhtem Riboflavin-gehalt⁴⁴, oder aus Naphthalin läßt sich Salicylaldehyd herstellen^{13 a}.

Fast täglich kündigt die Presse neuartige Möglichkeiten an¹⁴, aber auch wissenschaftliche Informationen beginnen in den letzten Jahren reichlicher zu fließen. Die folgenden Ausführungen beruhen neben dem Literaturstudium – ausgezeichnete Überblicksreferate finden sich bei^{6, 7, 15, 16, 17, 17 a, 4} – auf der eigenen Beschäftigung mit der kontinuierlichen Züchtung von Hefe¹⁸.

2. Biologie

2.1. Das Wachstum von Mikroorganismen auf Kohlenwasserstoffen

2.1.1. Technisch wichtige Organismen

Die umfangreiche Übersicht über Mikroorganismen, welche aliphatische oder zyklische Kohlenwasserstoffe als einzige C-Quelle verwerten können, wurde bereits erwähnt (FUHS¹⁰). Aber auch neuere Arbeiten zeigen die Vielgestaltigkeit der Flora in Ölfeldern auf (IZUKA und KOMAGATA¹⁹).

Nach Ansicht einiger Fachleute kommt gegenüber den Bakterien den Hefen größere technische Bedeutung zu, weil sie höhere Ausbeuten ergeben, leichter von der Nährlösung abzutrennen sind und die Züchtungen, des saureren Milieus wegen, durch Fremdorganismen weniger leicht kontaminiert werden. Allerdings sind in neuester Zeit Bakterien in den Vordergrund gerückt²⁰, da sie rascher wachsen als Hefen (vgl. Tabelle 1) und auch gasförmige Kohlenwasserstoffe verwerten können. Doch scheinen vorderhand die Hefen, vor allem Arten vom Typus der Futterhefen (*Candida* sp.), größere wirtschaftliche Bedeutung zu versprechen^{21, 22, 23, 24, 25, 26}.

Tabelle 2. Wachstum und Ausbeuten einer Mischkultur von *Candida intermedia* und *Candida lipolytica* auf verschiedenen *n*-Alkanen (nach MILLER und JOHNSON²³). In diesen Versuchen sind die festen Alkane durch Pristan in Lösung gebracht worden

C-Quelle	Generationszeit (h)	TS gebildet · 100	M CO ₂	C-Ausbeute* (inkl. CO ₂) %	Gehalt der Zelle an	
		Substrat verbraucht %	M Alkan		Rohprotein %	Lipid %
Flüssige Alkane						
C ₁₆ H ₃₂	4,0	86,5	6,0	89,2	42,0	4,6
C ₁₆ H ₃₄	4,5	78,0	5,0	75,6	35,4	11,2
C ₁₇ H ₃₆	5,5	74,2	5,8	76,0	34,4	9,2
C ₁₈ H ₃₈	5,0	83,9	4,8	74,0	35,4	13,4
Feste Alkane						
C ₂₀ H ₄₂	3,5	81,7	8,0	86,5	45,1	3,2
C ₂₂ H ₄₆	3,0	89,5	7,8	86,4	47,6	1,9
C ₂₄ H ₅₀	4,0	89,5	9,5	90,0	46,0	3,6
C ₂₈ H ₅₈	8,0	88,4	12,1	93,0	45,2	3,7
C ₃₈ H ₇₄	19,0	—	—	—	—	—

* bezogen auf C-Gehalt der Zellen von 48%

Diese Organismen sind in Abwasser von Raffinerien vielfach vertreten²⁷ und von dort isoliert worden. Sie sind als Eiweißproduzenten sehr geeignet.

2.1.2. Wachstumsgeschwindigkeit und Ausbeuten

Die Verdopplungszeiten der Hefen sind im allgemeinen länger als diejenige von Bakterien. Auf Kohlenhydraten werden in synthetischen Medien Generationszeiten von 1 h erreicht, die Ausbeute an Biomasse aus 100 g Glucose beträgt 50 g oder mehr (FIECHTER²⁸). Bei Verwendung von Alkanen als C-Quelle resultieren je nach Kettenlänge des Substrates Verdopplungszeiten von mehreren Stunden, andererseits aber Ausbeuten (vgl. Tabellen 2 und 3), die ohne weiteres 90% erreichen können.

Gemäß Tabelle 3 und anderen Quellen^{21, 24} sind es vor allem die normalen Paraffine, welche mit hohen Ausbeuten an Biomasse assimiliert werden. Da *n*-Alkane mit mehr als 18 C-Atomen bei den üblichen Brutttemperaturen von 28 bis 30° fest sind, müssen diese Verbindungen durch geeignete Methoden in Lösung gebracht werden (z. B. mit Pristan = 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan). Vgl. hierzu HUMPHREY⁴.

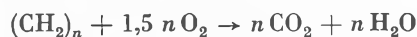
Aus den Versuchen von MILLER und JOHNSON nehmen wir zur Kenntnis, daß

- das Wachstum um so langsamer wird, je schwerer und viskoser die Fraktion ist,
- der Ausnützungsgrad der Fraktion abnimmt, je länger die Generationszeiten werden,
- die Benützung einer Mischkultur zu den hohen Ausbeuten geführt hat.

2.1.3. Sauerstoffbedarf

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Organismenzüchtung auf Kohlenwasserstoffen ist der hohe Sauerstoffbedarf. Gegenüber den Kohlenwasserstoffen muß bei vollständiger Oxydation, wie die Summgleichungen zeigen, pro abgegebenem Molekül CO₂ im ersteren Falle mehr O₂ zugesetzt werden:

Kohlenwasserstoffe:



$$\text{CO}_2 : \text{O}_2 = 0,67$$

Kohlenhydrate:



$$\text{CO}_2 : \text{O}_2 = 1,0$$

Tabelle 3. Wachstum und Ausbeuten einer Mischkultur von *Candida intermedia* und *Candida lipolytica* auf verschiedenen Fraktionen von Gasöl (nach MILLER und JOHNSON²³). Gasöl ist eine Petrofrac tion, die zwischen Kerosen und Schmieröl destilliert

Fraktionen	Dichte	S-Gehalt % (W/W)	Siedebereich °C	Generationszeit h	Ausbeute in % bezogen auf KW-Fraktion	bezogen auf <i>n</i> -Fraktion	Ausnützung der <i>n</i> -Paraffine in %
A Heizöl	0,845	0,29	182–409	4,0	12,7	72,6	95–96
B Heizöl, mittel	0,874	0,58	86–515	4,0–4,5	10,6	89,8	81–98
C Crack-Mischung	0,910	0,91	71–477	5,0–6,0	9,3	76,1	95–98
D Wachsdestillat	—	—	—	5,5–6,5	8,0	79,3	94
E Viscose, hochsiedend	—	—	—	9,0–9,5	4,5	95,6	72

Für die Bildung von Biomasse hat JOHNSON¹⁵ den O₂-Bedarf auf der Basis von 50% Ausbeute bei Kohlenhydraten und 100% bei Kohlenwasserstoffen theoretisch berechnet. Er fand den O₂-Bedarf im letzteren Falle 2,6-fach so hoch. Dieser hohe Bedarf kann bei der Züchtung dazu führen, daß die O₂-Versorgung zum wachstumsbegrenzenden Faktor wird. In Kleinfementern üblicher Konstruktion konnten MILLER und JOHNSON tatsächlich nur 10 bis 15 g Zelltrockensubstanz ausreichend mit O₂ versorgen (vgl. hierzu auch SHARPLEY²⁹, S. 68 ff.).

2.2. Substratspezifität

Bei den für die biologische Eiweißsynthese verwendeten Erdölfractionen handelt es sich um Gemische von Kohlenwasserstoffen. Fractionen mit engem Siedebereich können ohne weiteres 300 verschiedene Verbindungen enthalten und solche mit weitem – wie etwa Gasolin – bis zu mehreren tausend²⁹. ZOBELL⁷ hat 1950 vier Regeln über den biologischen Abbau der verschiedenen Kohlenwasserstoffverbindungen aufgestellt, die heute wegen zahlreicher Ausnahmen wohl revidierungsbedürftig sind, vorderhand aber doch einen gewissen Überblick vermitteln.

- Aliphatische Verbindungen werden durch Mikroorganismen leichter angegriffen als aromatische.
- In der Regel werden lange Ketten eher abgebaut als kurze.
- Ungesättigte werden leichter abgebaut als gesättigte.
- Verzweigte Ketten werden leichter abgebaut als gerade.

Aus diesen Regeln ist zu entnehmen, daß der Abbau der Kohlenwasserstoffe spezifisch erfolgt. Nachstehend werden drei Beispiele von Substratspezifität aufgeführt, die sich auf die Länge aliphatischer C-Ketten, ihre Löslichkeit und ihre Konstitution beziehen.

2.2.1. Länge der Kohlenstoffkette

Nach der zweiten Regel von ZOBELL werden längere Ketten eher abgebaut als kurze, obschon auch hier Ausnahmen bekannt sind.

Kurze Ketten sind gute Lösungsmittel für Lipide und können daher durch ganze oder teilweise Zerstörung der Phospholipidmicellen der Zellwand toxisch wirken. Ungestörtes Wachstum erhält man, abgesehen von Methan, im allgemeinen erst mit Kettenlängen von 8, nach KOMAGATA und Mitarbeitern³⁰, die mit *Candida* arbeiteten, erst mit 9 oder mehr C-Atomen.

2.2.2. Löslichkeit

Die Löslichkeit von *n*-Alkanen nimmt mit steigender C-Zahl rasch ab (Abb. 1). Eine experimentelle Bestimmung der Löslichkeit bis 8 C stammt von MCAULIFFE³¹.

JOHNSON¹⁵ hat durch Extrapolation weitere Werte berechnet und für Kettenlängen von mehr als 8 C-Atomen

Tabelle 4. Löslichkeit von *n*-Alkanen in Wasser. Die Werte für die C₁₀-, C₁₂- und C₁₄-Ketten sind aus Abb. 1 durch JOHNSON¹⁵ extrapoliert worden

<i>n</i> -Alkane	Molare Konzentration der gesättigten Lösung
Hexan	$1,1 \cdot 10^{-4}$
Oktan	$5,8 \cdot 10^{-6}$
Decan	$3,1 \cdot 10^{-7}$
Dodecan	$1,7 \cdot 10^{-8}$
Tetradecan	$9,8 \cdot 10^{-10}$

men so niedrige Werte gefunden, daß die Aufnahme solcher Verbindungen durch die lebende Zelle nur schwer erklärbar ist. Nach Tabelle 4 besitzt Tetradecan eine molare Sättigungskonzentration von $9,8 \cdot 10^{-10}$; diese Verbindung ist aber bei 25°C noch keineswegs fest. HOPKINS und CHIBNALL³² beobachteten sogar Wachstum von *Aspergillus versicolor* auf geraden Ketten mit 34 C-Atomen. Daher müßten solche Verbindungen in fester Form angegriffen werden. Nun hat BAKER³³ bereits 1956 mit radioaktiven Markierungsmethoden gezeigt, daß die Löslichkeit von C₁₀- bis C₁₈-Molekülen nicht so stark abnimmt, wie JOHNSON extrapoliert hat; er fand für Decan eine Löslichkeit von 16 p.p.m., für Octadecan 6 p.p.m. Dieser Löslichkeitsstabilisierung wird gegenwärtig die Aufnahme längerer Ketten zugeschrieben.

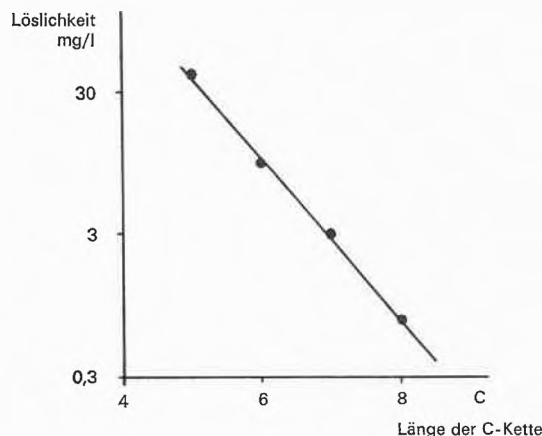


Abb. 1. Wasserlöslichkeit von *n*-Alkanen nach MCAULIFFE³¹. Stark abnehmende Löslichkeit mit steigender C-Zahl

2.2.3. Konstitution

Wie Abb. 2 zeigt, trifft auch die vierte Regel von ZOBELL, wonach verzweigte Ketten leichter abgebaut werden als gerade, nur bedingt zu. In diesen Experimenten mit einer *Pseudomonas*-Art muß der unverzweigte Kettenteil mindestens 4 Atome lang sein, und das Beispiel der Abb. 3 mit einem Organismengemisch zeigt, daß die sulfonierten Diheptylketten um so besser angegriffen werden, je länger die freien Enden sind. Der

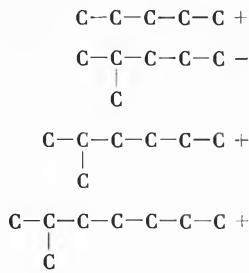


Abb. 2. Wachstum von *Pseudomonas* auf verzweigten Kohlenwasserstoffketten (nach THIJSSSE und ZWILLING-DE VRIES⁵⁰. Der unverzweigte Kettenteil muß mindestens 4 C-Atome umfassen

maximale Abbau von 80% tritt nur auf, wenn die unverzweigten Enden beider Ketten eine Länge von 5 C-Atomen aufweisen (SWISHER³⁴).

Diese wenigen Beispiele von Substratspezifität deuten eindrücklich auf die bestehende Mannigfaltigkeit im Stoffwechselgeschehen des Kohlenwasserstoffmetabolismus.

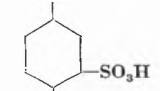
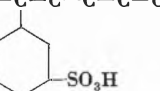
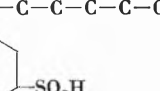
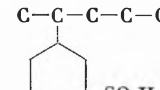
Diheptyl-Benzen-Sulfonate	Biologischer Abbau in %
$\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}$ 	17
$\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}$ 	40
$\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}$ 	80
$\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}$ 	45

Abb. 3. Abbau von Diheptyl-Benzen-Sulfonat mit aktivem Schlamm (nach SWISHER³⁴)

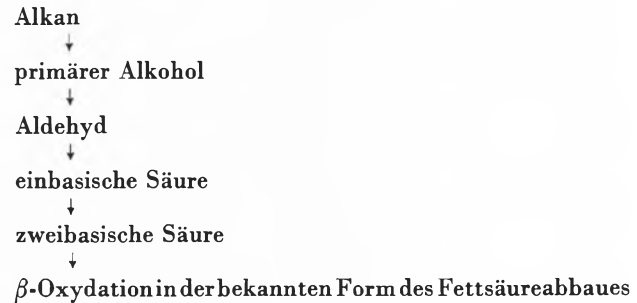
2.3. Stoffwechselmechanismen

Es ist leicht verständlich, daß bei der Vielfalt an biologisch abbaubaren Verbindungen der Metabolismus noch keinesfalls abschließend aufgeklärt ist. Viele Fakten sind bekannt und z. B. von MCKENNA und KALLIO³⁵ vor kurzem zusammengestellt worden. Es ist hier nicht

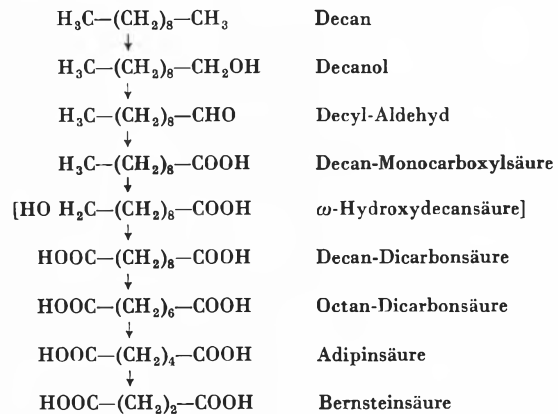
möglich, die heute bekannten Stoffwechselmechanismen vollständig darzustellen, aber auf das Abbauprinzip der aliphatischen Alkane soll kurz eingegangen werden.

Die mikrobielle Oxydation aliphatischer Alkane wird im allgemeinen als monoterminale angenommen.

IIZUKA und Mitarbeiter²⁶ geben zahlreiche Belege für den monoterminale Angriff, doch sind mindestens zwei Beispiele aus jüngster Zeit mit je einem Stamm eines Bakteriums und einer Hefe von biterminalem Angriff der Paraffinkette bekanntgeworden²⁶. Die generelle Abbaufolge wäre demnach folgende:



Wichtig ist der Nachweis von Bernsteinsäure, woraus die Autoren den Schluß ziehen, daß der Abbau über Adipinsäure und Bernsteinsäure in den Atmungszyklus einmündet. Am Beispiel von Decan sieht der Reaktionsmechanismus daher wie folgt aus:



(Am Beispiel von *Candida rugosa* JF 101 bewiesen.)

Bei den aromatischen Verbindungen sind die Verhältnisse komplizierter; nach HUMPHREY⁴ finden sich zwei Möglichkeiten für die Ringöffnung. Wichtig erscheint auch hier, daß der Abbauweg schließlich in den Atmungszyklus einmündet (SHARPLEY²⁹, S. 97, GIBSON *et al.*³⁶).

Endprodukte der Stoffumwandlung sind die bekannten Stoffklassen der Proteine, Lipide, Glycolipide, Kohlenhydrate; zum Teil werden sogar Wachse gebildet, wie dies bei *Nocardia* beobachtet wurde (RAYMUND und DAVIS³⁷). Bei *Nocardia* änderte das gegenseitige Verhältnis von Lipid-, Protein- und Kohlenhydratgehalt sehr

stark in Funktion der Sauerstoffversorgung, wie folgende Zusammenstellung zeigt:

	Lipid %	Protein %	Kohlenhydrat %
<i>n</i> -Octadecan, 10% O ₂	73,2	14,4	12,4
<i>n</i> -Octadecan, 20% O ₂	56,0	20,8	23,2
<i>n</i> -Hexan, 20% O ₂	28,0	46,1	26,0

Es ist anzunehmen, daß auch bei der Züchtung von Hefe die Zusammensetzung der gewonnenen Biomasse je nach Substrat und Züchtungsbedingungen mehr oder weniger größeren Änderungen unterworfen ist.

3. Technologie

Technologisch bestehen bei der biologischen Gewinnung von Eiweiß aus Kohlenwasserstoffen für Ernährungszwecke drei Probleme, an deren Lösung mit großem Aufwand gearbeitet wird, nämlich die

- Umwandlung der Kohlenwasserstoffe in Eiweiß, also die eigentliche Züchtung,
- Separierung der Organismen aus der Emulsion,
- Veredlung, d. h. die Herstellung einer für die menschliche und tierische Ernährung geeigneten Form.

Über die Technologie besteht teilweise eine recht ausgedehnte Patentliteratur; vieles befindet sich noch im Entwicklungsstadium und kann bald überholt sein. Es wird daher nur der prinzipielle Weg der biologischen Eiweißgewinnung skizziert und im übrigen auf einige bestehende Schwierigkeiten aufmerksam gemacht.

3.1. Züchtung

Im Hinblick auf die in Zukunft zu lösenden Welt-ernährungsprobleme müssen große Mengen von Kohlenwasserstoffen in Eiweiß umgewandelt werden können. Der Deparaffinierungsprozeß mit Mikroorganismen ist daher sehr leistungsfähig auszugestalten.

Die Organismen werden in einem aus vier verschiedenen Phasen bestehenden Reaktionssystem gezüchtet, wobei die Kohlenwasserstoffe in einer Menge zugegeben werden, die höchstens 10% des gesamten Flüssigkeitsvolumens ausmacht. Außer dieser öligen und der die übrigen Nährstoffe enthaltenden wässrigen Phase, die möglichst fein emulgiert werden müssen, tritt neben der Gasphase (Belüftungsluft) im Verlaufe der Züchtung die feste Phase (Organismen) dazu. Die wässrige Phase enthält Stickstoff- und Phosphorverbindungen, Mg, K und Spurenelemente. Für gutes Hefewachstum sind je nach Stamm auch Vitamine notwendig^{38, 39, 40}. Ein synthetisches Medium, das für die Züchtung von Bäckerhefe entwickelt worden ist und sich ebenfalls für gutes

Tabelle 5. Beispiel einer synthetischen Nährlösung zur Züchtung von Hefe (nach FIECHTER²⁸)

Zusätze	g/l
Glucose	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,28
NH ₄ H ₂ PO ₄	2,45
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,75
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,112
Hefeextrakt (Difco)	0,5
Asparagin	3,75
	mg/l
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	7,78
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	37,5
Biotin	0,035
<i>m</i> -Inosit	100
Ca-Pantothenat	5
Adermin	2,5
Thiamin	10

Wachstum von *Candida* eignet, ist beispielsweise in Tabelle 5 aufgeführt. Aus dieser Übersicht können die zum Hefewachstum notwendigen Substanzen entnommen werden.

Für die Züchtung werden entweder vielgestaltige Gemische⁴¹ – also Destillate mit einem weiten Siedepunktbereich, wie Gasolin, Kerosene und Schmieröle verwendet⁴², wobei vor allem die länger-kettigen Alkane von 10 und mehr C-Atomen abgebaut werden, oder man geht neuerdings auch dazu über, definiertere Fraktionen oder Methan (vgl. WOLNAK *et al.*⁴³) zu verwenden. Beispielsweise stellt man durch Destillation zwei Fraktionen her und baut die schwerere biologisch ab, wobei die unverzweigten Alkane verschwinden⁴², oder man reinigt die Fraktionen z. B. mittels Molekularsieben, um später zu ganz definierten Endprodukten, wie Aminosäuren, zu gelangen.

Im allgemeinen wird die Züchtung batch-weise durchgeführt, kontinuierliche Verfahren sind selten erwähnt^{20, 44, 45}.

Als Fermenter scheinen vorderhand die für Futterhefen üblichen Systeme verwendet zu werden, wobei der im Abschnitt 2 erwähnte hohe O₂-Bedarf, die erforderliche Emulgierung und die gute Durchmischung aller vier Phasen eine wichtige Rolle spielen. Im Hinblick auf die spezifischen Probleme der Kohlenwasserstoffvergärung werden aber neue Fermentersysteme entwickelt (vgl. N. BLAKEBOROUGH *et al.*⁴⁶), ein sogenanntes Air-Lift-Fermentersystem wird dort näher beschrieben und Verbesserungsmöglichkeiten für den Massentransfer angegeben. Die Abfuhr der anfallenden Wärmemengen bei hohen Leistungen bereitet offensichtlich Schwierigkeiten²⁰, und Emulgierungssysteme mit starker Wirkung erschweren andererseits den notwendigen Gasaustausch, weil die entstehenden Emulsionen sehr stabil sein können. Im emulgierten Zustand nimmt das Reaktionsgemisch ein sehr großes Volumen ein und setzt damit die spezifische Leistung eines gegebenen Fermenterraumes stark herab.

HUMPHREY⁴ hat dieses Problem mit einer Kostenberechnung illustriert und daraus den Schluß gezogen, daß trotz der höheren Ausbeuten die Verwendung von Kohlenwasserstoffen gegenüber den Kohlenhydraten wirtschaftlich keine Vorteile bietet. Er sieht ein großes ungenutztes Potential bei der Verwendung von Naturgas, weil damit die ölige Phase, welche die verfahrenstechnischen Schwierigkeiten mit sich bringt, entfällt.

Die in der Praxis erreichbaren Ausbeuten sind sehr hoch; pro 1 kg Alkan werden 1 kg Sauerstoff und 0,2 kg Nährsalze benötigt, aus denen 1 kg trockener Biomasse mit einem Proteingehalt von 50 bis 70% entstehen²⁰. Bei Hefen liegt der Proteingehalt in den meisten Fällen im Bereich von 50% oder sogar darunter, wie die Zusammenstellung aus einer typischen Hefezüchtung in Tabelle 6 zeigt.

Prognosen über mutmaßliche Weiterentwicklung der Züchtungsverfahren sind heute kaum möglich. Es

Tabelle 6. Zusammensetzung von Trockenhefe aus einer Kohlenwasserstoffzüchtung (nach CHAMPAGNAT und Mitarbeiter²)

	Anteile in Gew.-%
Wasser	7,03
Total-N	6,92
Eiweiß	43,6
Lipide	18,5
Kohlenhydrate (Stärke)	21,9
Asche	4,43
Ca	0,211
P	1,250
K	0,500
Na	0,060

scheint aber, daß bei Verwendung von Alkanen noch nicht alle Möglichkeiten der modernen Verfahrenstechnik ausgeschöpft sind und es einer fruchtbaren Zusammenarbeit zwischen Mikrobiologen und Ingenieuren bedarf, wenn weitere Fortschritte auf diesem an sich dankbaren Betätigungsfeld erzielt werden sollen.

3.2. Separierung

Die Separierung von Hefezellen aus zuckerhaltigen Nährlösungen ist technisch gut lösbar. Die bewachsenen Suspensionen werden zentrifugiert, die entstandene Hefecreme gewaschen und auf dem Vakuumdrehfilter auf einen Wassergehalt von rund 30% Trockensubstanz gebracht (Bäckerhefe). Futterhefe dagegen wird auf dem Walzentrockner getrocknet.

Die Abtrennung von Hefe aus paraffinhaltigen Emulsionen ist weniger einfach, da die unabgebaut gebliebenen Kohlenwasserstoffe nicht nur zwischen den Zellen, sondern teilweise auch in den Zellen selber zurückbleiben.

Durch Zusatz von oberflächenaktiven Mitteln wird die Emulsion bei der Zentrifugation zerstört, und es resultiert eine ölig-klebrige Hefemasse. Die vollständige

Entfernung der Kohlenwasserstoffreste erfordert großen Aufwand in mehreren Stufen, wobei die Zellen erneut mit oberflächenaktiven Mitteln behandelt werden müssen. Einige Verfahren sind in der Patentliteratur beschrieben^{47, 41, 48}, vieles befindet sich noch in Entwicklung. Sofern das gewonnene Zellmaterial für direkte menschliche Ernährung vorgesehen ist, werden sicher die Lebensmittelhygieniker vorderhand Bedenken haben, dieses Nahrungsmittel für den allgemeinen Gebrauch wegen den kanzerogenen Eigenschaften, die zahlreichen Kohlenwasserstoffverbindungen zukommt, freizugeben.

3.3. Veredlung

Wenn sich auch in der Entwicklung der Petromikrobiologie neue Richtungen, wie Synthese von Aminosäuren oder Nucleinsäuren, abzuzeichnen beginnen, steht doch im jetzigen Stadium immer noch die Hefeherstellung aus Deparaffinierungsprozessen im Vordergrund. Aber auch bakterielles Protein wird schon gewonnen⁴⁹.

Nach dem jetzigen Stand der Technik muß die erzeugte Biomasse der tierischen Ernährung zugeführt werden, da das anfallende Produkt – ein mehr oder weniger weißes Pulver mit wenig Geschmack – kaum Anreiz zum direkten Genuß bietet. Auch wenn immer wieder betont wird, daß ernährungsphysiologisch damit ein sehr wertvolles Nahrungsmittel zur Verfügung steht, wird die anfallende Biomasse doch als Rohprodukt gelten müssen, das noch einer Veredlung bedarf.

Die Tabellen 7 und 8 beweisen tatsächlich den ernährungsphysiologisch hohen Wert von Hefe, die aus petrobiologischen Prozessen stammt. Von den essentiellen Aminosäuren wird besonders der hohe Gehalt an Lysin mit 11,6%, das in Mehl fast fehlt, herausgehoben und

Tabelle 7. Gehalt an essentiellen Aminosäuren in Eiweiß verschiedener Herkunft (nach CHAMPAGNAT und Mitarbeiter²). Von den Autoren wird besonders der hohe Gehalt der Hefe aus Paraffinen an Lysin hervorgehoben

	Weizenmehl	Kuhfleisch	Kuhmilch	Futterhefe	Hefe aus Erdöl (BP)
Proteingehalt der Trockensubstanz in %	13,2	59,4	33,1	44,4	43,6
Gehalt an Aminosäuren in %					
Leucin	7,0	8,0	11,0	7,6	7,0
Isoleucin	4,2	6,0	7,8	5,5	3,05
Valin	4,1	5,5	7,05	6,0	8,4
Threonin	2,7	5,0	4,7	5,4	9,1
Methionin	1,5	3,2	3,2	0,8	1,2
Lysin	1,9	10,0	8,7	6,8	11,6
Arginin	4,2	7,7	4,2	4,1	8,0
Histidin	2,2	3,3	2,6	1,7	8,1
Phenyl-Alanin	5,5	5,0	5,5	3,9	7,9
Tryptophan	0,8	1,4	1,5	1,6	1,17
Cystin	1,9	1,2	1,0	1,0	0,1

Tabelle 8. Vitamingehalt einiger Lebensmittel verglichen mit dem Tagesbedarf des Menschen (nach CHAMPAGNAT und Mitarbeiter²). Der hohe Vitamingehalt der «Paraffin»-Hefe ist augenscheinlich

Vitamin	Kuhfleisch mg/kg	Milch mg/kg	Futterhefe mg/kg TS	Hefe aus Erdöl mg/kg TS	Tagesbedarf des Menschen in mg
B ₁ , Thiamin	1-3	0,3-0,7	2-20	3-16	2
B ₂ , Riboflavin	2	1-3	30-60	75	3
Nicotinsäure	4-100	1-5	200-500	180-200	15
Pantothensäure	7-21	1-4	30-200	150-192	3
B ₆ , Adermin	1-4	1-3	40-50	23	2
B ₁₂ , Cobalamin				0,11	0,01

damit die physiologisch wertvolle Ergänzungsmöglichkeit von Eiweiß höherer Pflanzen angedeutet (Tabelle 7). Auch der Vitamingehalt ist teilweise sehr viel höher als in anderen Lebensmitteln.

Ein noch vorteilhafteres Bild zeigt eine neuere und umfassendere Analyse²⁰:

Thiamin	11 - 13	mg/kg
Riboflavin	110 - 130	mg/kg
Pyridoxin	4,8 - 7,6	mg/kg
Vitamin B ₁₂	0,11 - 0,17	mg/kg
Niacin	165 - 200	mg/kg
p-Aminobenzoensäure	2,9 - 5,6	mg/kg
Biotin	0,1 - 1,6	mg/kg
Ca-Pantothemat	14 - 23	mg/kg
Cholin	1,8 - 2,4	mg/kg
Inosit	35 - 41	mg/kg

Für den Proteingehalt von Hefe werden hier 54% und für Bakterien sogar 62-73% angegeben.

Die Aussichten für die Verbesserung der Ernährungslage in der Welt durch die petrobiologischen Prozesse sind verlockend. Die Zukunft wird zeigen, ob es der mikrobiologischen Verfahrenstechnik und den Lebensmittelfachleuten gelingen wird, die biologische Eiweißsynthese wirklich zu einer Grundlage der Nahrungsmittelbeschaffung zu machen.

Literatur

- SH. AIBA, A. E. HUMPHREY und N. F. MILLIS, *Biochem. Eng.* (New York) 1965, 15.
- A. CHAMPAGNAT, C. VERNET, B. LAINE und J. FILOSA, *Nature* (London) 197 (1963) 13.
- H. J. BUNKER, *Microbial Food in Global Impacts of Appl. Microb.* 1964, 234.
- H. IZUKA und K. KOMAGATA, *Soil & Microbiol.* 1961.
- A. E. HUMPHREY, *Biotechn. & Bioeng.* 9 (1967) 3.
- F. FUST, W. SCHNABEL und S. UHLMANN, *Die Brauerei* (Wissenschaftliche Beilage) 1951, Heft 8, S. 57, Heft 9, S. 71.

- E. BEERSTECHE, *Petroleum Microbiology*, New York (1954).
- C. E. ZOBELL, *Bact. Rev.* 10 (1946) 1; *Adv. Enzymol.* 10 (1950) 443.
- J. B. DAVIS und D. M. UPDEGRAFF, *Bact. Rev.* 18 (1954) 215.
- W. J. NICKERSON und R. G. BROWN, *Adv. Appl. Microbiol.* 7 (1965) 225.
- G. W. FUHS, *Arch. Mikrob.* 39 (1961) 374.
- A. CHAMPAGNAT, *Scientific American* 213 (1965) 13.
- A. CHAMPAGNAT, *Bull. Fed. Soc. Gynecol. Obstet. Langue Franç.* 15, XIV, XVI, XVIII, XX, XXII.
- Y. IMADA, J. TAKAHASHI, K. YAMADA, K. UCHIDA und K. AIDA, *Biotechn. & Bioeng.* 9 (1967) 45.
- K. YAMADA, J. TAKAHASHI und K. KOBAYASHI, *Nature* 198 (1963) 1115.
- I. D. HILL und A. GORDON, *Biotechn. & Bioeng.* 9 (1967) 91.
- Anonym, *Chem. & Eng. News* 44 (1966) 20.
- M. J. JOHNSON, *Chem. & Ind.* 1964 (5. September) 5.
- J. W. FOSTER, *Ant. v. Leeuwenhoek* 28 (1962) 241.
- J. W. FOSTER, *Oxygenases*, New York 1962.
- W. C. EVANS, *J. Gen. Microb.* 32 (1963) 177.
- A. FIECHTER, *Habilitationsschrift ETH*, Zürich 1966.
- H. IZUKA und K. KOMAGATA, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 10 (1964) 207, 223, 11 (1965) 1, 15, 91, 103, 331.
- Anonym, *Chem. & Eng. News* 45 (1967) 46.
- E. AZOULAY, P. COUCHOUD-BEAUMONT und J.-G. SENEZ, *Ann. Inst. Pasteur* 107 (1964) 520.
- TH. L. MILLER, ST. LIE und M. J. JOHNSON, *Biotechn. & Bioeng.* 6 (1964) 299.
- TH. L. MILLER und M. J. JOHNSON, *Biotechn. & Bioeng.* 8 (1966) 549.
- S.-I. OTSUKA, R. ISHII und N. KATSYA, *J. Gen. Appl. Microb.* 12 (1966) 1.
- H. IZUKA, M. SUEKANE und Y. NAKAJIMA, *J. Gen. Appl. Microb.* 11 (1965) 153.
- H. IZUKA, M. IIDA und Y. UNAMI, *J. Gen. Appl. Microb.* 12 (1966) 119.
- N. D. JERUSALEMSKII, E. A. ANDREEVA, E. L. GRISHANKVA, E. L. GOLOVLEV, V. V. DOROKHOV und L. N. ZHUKOVA, *Prkladnaya Biokhim. Mikrobiol.* 1 (1965) 163.
- A. FIECHTER, im Druck.
- J. M. SHARPLEY, *Elementary Petroleum Microbiology*, Houston o. J.
- K. KOMAGATA, T. NAKASE und N. KATSUYA, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 10 (1964) 313.
- C. MCAULIFFE, *Nature* (London) 200 (1963) 1092.
- S. J. HOPKINS und A. C. CHIBNALL, *Biochem. J.* 26 (1932) 133.
- E. G. BAKER, *ACS Petroleum Div. Reprints* 1 (April 1956).
- R. D. SWISHER, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 40 (1963) 648.
- E. J. MCKENNA und R. E. KALLIO, *Ann. Rev. Microbiol.* 19 (1965) 183.
- D. T. GIBSON, J. M. WOOD, P. J. CHAPMAN und S. DACLEY, *Biotechn. & Bioeng.* 9 (1967) 33.
- R. L. RAYMOND und J. B. DAVIS, *Appl. Microbiol.* 8 (1960) 329.
- The British Petroleum Co. Ltd., *Niederländ. Pat.* 6413217 (17. Mai 1965).
- The British Petroleum Co. Ltd., *Niederländ. Pat.* 296126 (10. Mai 1965).
- Société Française des Pétroles BP, *Franz. Pat.* 1393337 (1965).
- Société Française des Pétroles BP, *Franz. Pat.* 1393337 (Cl 10 g, Cl 2 d, 1965).
- British Petroleum Co. Ltd., *Niederländ. Pat.* 294223 (1965).
- Société Française des Pétroles BP, *Franz. Pat.* 1416057 (1965).
- B. WOLNAK, B. H. ANDREEN, J. A. CHISHOLM jr. und M. SAADEH, *Biotechn. & Bioeng.* 9 (1967) 57.
- S. A. J. WASE, *J. Gen. Microb.* 42 (1966) 13.
- R. J. ERTOLA, M. D. LILLY und F. C. WEBB, *Biotechn. & Bioeng.* 7 (1965) 309.
- N. BLAKEBOROUGH, P. G. SHEPHERD und I. NIMMONS, *Biotechn. & Bioeng.* 9 (1967) 77.
- British Petroleum Co. Ltd., *Brit. Pat.* 914567 (1965).
- British Petroleum Co. Ltd., *USA Pat.* 3268412 (Cl 195-3, 1966).
- Esso Research and Engineering Co., *Niederländ. Pat.* 6514591 (1966).
- G. J. THUSSE und J. T. ZWILLING-DE VRIES, *Ant. v. Leeuwenhoek* 25 (1959) 332.