

Über den Einfluß  
von Spurenelementen auf Wachstum  
und Enzyymbildung von *Aspergillus*  
*oryzae* (Ahlburg) Cohn

Von der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE IN ZÜRICH  
zur Erlangung der Würde eines Doktors  
der technischen Wissenschaften  
genehmigte  
PROMOTIONSARBEIT

Vorgelegt von  
  
Karl Steiner  
dipl. Ing.-Agr. ETH  
von Schänis (SG)

Referent: Herr Prof. Dr. L. Ettliger  
Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Deuel

1 9 6 0

---

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt i. Thür.

Leer - Vide - Empty

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung . . . . .	47
II. Material und Methoden . . . . .	49
A. Organismen . . . . .	49
B. Kulturmethode(n) . . . . .	50
1. Impfmateriale und Impftechnik . . . . .	50
2. Nährlösungen . . . . .	50
3. Durchführung der Kulturversuche . . . . .	50
4. Bestimmung des Myzeltrockengewichtes . . . . .	50
5. Wasserstoffionenkonzentration . . . . .	50
C. Reinigungstechnik . . . . .	50
1. Allgemeines . . . . .	50
2. Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Methode . . . . .	52
3. Einfluß der Reinigungsart des Materials und des Verschlusses der Kultur- gefäße auf die Nullwerte . . . . .	55
4. Wasserqualität . . . . .	59
5. Spurenelemente . . . . .	60
6. Impfmateriale . . . . .	61
7. Extraktionsmethode . . . . .	63
8. Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Reinigungsmethoden . . . . .	65
D. Enzymatische Aktivitätsmessungen . . . . .	67
1. Bestimmung der dextrinogenen Aktivität . . . . .	67
2. Bestimmung der proteolytischen Aktivität . . . . .	69
E. Einfluß von pH und N-Quelle auf die Bildung dextrinogener Amylase . . . . .	72
1. Literatur . . . . .	72
2. Einfluß des pH der Nährlösung auf die Bildung extrazellulärer dextrino- gener Amylase . . . . .	72
3. Einfluß des pH auf die Stabilität dextrinogener Amylase . . . . .	73
4. Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung extrazellulärer dextrino- gener Amylase . . . . .	74
III. Einfluß von Spurenelementen auf Wachstum und Enzymbildung von <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i> . . . . .	76
1. Übersicht . . . . .	76
2. Einfluß von Zink . . . . .	77
3. Einfluß von Eisen . . . . .	81
4. Einfluß von Kupfer . . . . .	84
5. Einfluß von Mangan . . . . .	87
6. Einfluß von Magnesium . . . . .	89
7. Einfluß höherer Ca-Gaben bei optimaler und suboptimaler Mg-Ver- sorgung . . . . .	92
8. Einfluß einiger Spurenelement-Mangelkombinationen . . . . .	95
IV. Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Bildung dextrinogener Amylase . . . . .	96
1. Literatur . . . . .	96
2. Experimentelles . . . . .	97
3. Ergebnisse . . . . .	97
4. Besprechung der Ergebnisse . . . . .	100
V. Diskussion . . . . .	103
VI. Zusammenfassung . . . . .	104
Schrifttum . . . . .	105

[Aus dem Institut für landw. Bakteriologie und Gärungsbiologie der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich]

## Über den Einfluß von Spurenelementen auf Wachstum und Enzyymbildung von *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn<sup>1)</sup>

Karl Steiner

Mit 4 Abbildungen im Text

### I. Einleitung

Aus zahlreichen Arbeiten ist bekannt, daß die Elemente Zn, Fe, Cu, Mn und Mo das Wachstum von Schimmelpilzen, die Konidien- und Farbstoffbildung sowie allgemein den Stoffwechsel entscheidend beeinflussen (FOSTER 1939, FOSTER 1949, PERLMAN 1949, COCHRANE 1958).

Die genannten Metallionen werden als Spurenelemente bezeichnet, weil sie, verglichen mit den übrigen Bestandteilen einer Nährlösung (C- und N-Quelle, K, P, S, Mg), nur in äußerst geringen Konzentrationen benötigt werden. Nach COCHRANE (1958) sind, je nach der Zusammensetzung eines Mediums, 0,001—0,5 mg Zn, 0,1—0,3 mg Fe, 0,01—0,1 mg Cu, 0,005—0,01 mg Mn und 0,0001—0,01 mg Mo pro Liter Nährlösung erforderlich.

Neben den sicher lebensnotwendigen Elementen Zn, Fe, Cu, Mn und Mo kommt wahrscheinlich auch dem Ca Spurenelementcharakter zu, da der wachstumsfördernde Einfluß dieses Elements schon wiederholt bestätigt werden konnte. Ein allgemeiner Bedarf für Ca, V, B, Co und Se scheint hingegen noch nicht genügend gesichert (FOSTER 1949, COCHRANE 1958).

Spurenelemente sind als Verunreinigungen in den Makrobestandteilen einer Nährlösung enthalten. Ferner können auch die Kulturgefäße Spurenelemente an das Medium abgeben, und schließlich enthält auch das Impfmateriale Spurenelemente. Ohne besondere Reinigungsmaßnahmen, auf welche im Abschnitt über Methodik näher eingegangen wird, sind deshalb die Spurenelemente gewöhnlich in genügender Konzentration vorhanden, um optimale Myzel- und Konidienbildung zu ermöglichen. Die Spurenelemente können sich z. T. gegenseitig ersetzen oder in ihrer Wirkung beeinflussen (FOSTER 1949, KOCH und DÉDIC 1957 b). Bei Untersuchungen über den spezifischen Einfluß eines einzelnen Spurenelements sollten daher die vorhandenen Konzentrationen der übrigen Spurenelemente bekannt sein. Diese Forderung kann am besten erfüllt werden durch möglichst vollständige Entfernung aller Spurenelemente aus der Nährlösung mit einer besonderen Reinigungs-

<sup>1)</sup> Diese Untersuchungen wurden durch Mittel aus den Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes ermöglicht, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

methode und nachträglichem optimalem Zusatz aller Spurenelemente mit Ausnahme des einen Elements, dessen spezifischer Einfluß untersucht werden soll. Eine derartige Reinigungsmethode wurde erstmals von STEINBERG (1919) eingeführt.

BERTRAND (zit. in FOSTER 1949) vermutete schon 1910, daß die Spurenelemente, entsprechend der geringen benötigten Konzentrationen, als Biokatalysatoren wirken. Mit der raschen Entwicklung der Enzymologie in den letzten Jahrzehnten konnte u. a. gezeigt werden, daß viele Enzyme spezifische Spurenelemente in festgebundener Form enthalten. Häufig wirken Spurenelemente auch in freier Form als Aktivatoren von Enzymsystemen (LEHNINGER 1950, McELROY und NASON 1954, VALLEE 1955, MAHLER 1956, NICHOLAS 1957 b, LAMB et al. 1958, DIXON 1958). Die Vermutung von BERTRAND wurde also insofern bestätigt, als Spurenelemente zusammen mit Enzymen maßgeblich an der Biokatalyse beteiligt sind. Man ging deshalb in den letzten Jahren immer mehr dazu über, den Einfluß von Spurenelementen auf die Enzymbildung und Enzymaktivierung zu untersuchen.

In der folgenden Literaturbesprechung werden zuerst bisherige Ergebnisse über den Einfluß von Spurenelementen auf die Enzymbildung bei Schimmelpilzen und anschließend Arbeiten über Spurenelementversuche mit *Aspergillus oryzae* berücksichtigt.

*Aspergillus niger* (van Tieghem): HOFFMANN et al. (1949) stellten bei Mn-Mangel vermehrte Saccharasebildung und Hemmung der Katalasebildung fest. Zusätze von 40  $\gamma$  und 100  $\gamma$  Mn/Liter wirkten sich gerade umgekehrt auf die Bildung der beiden Enzyme aus. GORBACH et al. (1956, 1957) stellten durch Zusätze einzelner Elemente zu einem gereinigten Medium folgende Einflüsse auf die Saccharasebildung fest: Stimulierung durch Fe-, Zn- und Cu-Gaben; im Konzentrationsbereich von 0—10  $\gamma$ /100 ml, höhere Konzentrationen der genannten Elemente hemmten die Saccharasebildung. Auch bei gleichzeitiger optimaler Versorgung mit den übrigen Spurenelementen wirkten die genannten Elemente fördernd auf die Saccharasebildung. Nach BERTRAND und DE WOLF (1958 a) kann Zn nicht direkt an der Saccharasesynthese beteiligt sein, da Zn-Mangelmizel relativ mehr Saccharase enthält als Mizel bei optimaler Zn-Versorgung. BERTRAND und DE WOLF (1957, 1958 b) konnten jedoch zeigen, daß Zn unbedingt erforderlich ist zur Bildung von Aldolase sowie den Dehydrogenasen von Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconsäure. Nach GORBACH und KOCH (1955) ist die Bildung von Proteinase Zn- und Fe-abhängig.

*Neurospora crassa* (Shear et Dodge): NICHOLAS und NASON (1954), NICHOLAS (1957 a, c), MEDINA und NICHOLAS (1957), NICHOLAS und GOODMAN (1958) beobachteten folgende Spurenelementeinflüsse auf die Enzymbildung: Zink fördert die Bildung von Hexokinase, Glutaminsäuredehydrogenase, DPN- und TPN-Diaphorase. Eisen wirkt fördernd auf die Bildung von Cytochrom c-Reduktase, Katalase und Peroxydase. Molybdän fördert die Bildung von Katalase, Peroxydase und Nitratreduktase. Überschuß von Mo und Cu hemmen die Bildung von TPN-Diaphorase, nicht aber diejenige von DPN-Diaphorase, Katalase und alkalischer Phosphatase.

*Trichoderma viride* Pers. ex Fr.: MANDELS und REESE (1957) stellten fest, daß Cu die Amylasebildung hemmt, hingegen die Cellulasebildung fördert.

*Aspergillus*-Gruppe *flavus-oryzae*: (Bei keiner der zitierten Arbeiten über diese Gruppe wurde eine Reinigungsmethode zur Entfernung der Spurenelementverunreinigungen angewandt.)

HOFFMANN et al. (1950) stellten fest, daß bei Mn-Mangel (d. h. ohne Mn-Zusatz) die Saccharasebildung gefördert, bei Mn-Zusatz (40—100  $\gamma$ /Liter) gehemmt wird. Der Einfluß von Mn auf die Katalasebildung war gerade umgekehrt.

MAXWELL (1952) beobachtete eine Förderung der Proteinasebildung bei *A. flavus-oryzae* durch Fe. Die Bildung wurde gehemmt durch je 100  $\gamma$  Mn, Co, Ni und Mo/Liter.

Nach den Arbeiten von AKABORI et al. (1954), OIKAWA und MAEDA (1957) und OIKAWA (1959) enthält kristalline Taka-Amylase von *A. oryzae* ein Atom Ca pro Molekül in festgebundener, nicht dialysierbarer Form. Die Entfernung des nicht dia-

lysierbaren Ca mit EDTA (Aethylen-diamin-tetraessigsäure) bewirkte eine Inaktivierung der Amylase bis zu 97%. Durch wiederholtes Umkristallisieren konnte Ca ohne Aktivitätsverlust bis zu 40% durch Sr und bis zu 20% durch Mg ersetzt werden. Wurde das Ca in Kulturversuchen durch Sr ersetzt, so enthielt die kristallin isolierte Amylase vorwiegend Ca, angereichert aus den Verunreinigungen der Nährlösung, neben Sr.

Nach TAMIIYA (1929) sind Zusätze von Zn und Cu für optimales Wachstum von *A. oryzae* bei leicht saurem Kultivierungs-pH von 4—5 unerlässlich, während die gleichen Elemente bei höherem pH wachstumshemmend wirken sollen. Nach YAMAGATA et al. (1955) werden von *A. oryzae* folgende optimale Spurenelementzusätze pro Liter Nährlösung benötigt:  $10^{-1}$  Mol Mg,  $10^{-3}$  Mol Zn, Fe und Mn,  $10^{-6}$  Mol Cu. McHARGUE und CALFEE (1931) stellten fest, daß Zn, Cu und Mn die Myzelbildung bei *A. flavus* fördert, wobei der relative Proteingehalt des Myzels erniedrigt wird. Nach SIMONART und CHOW (1954) benötigt *A. oryzae* Ca für optimales Wachstum mit Caseinhydrolysat als C- und N-Quelle. Nach RAVEUX (1950) sind Zn und Fe für optimale Myzelbildung bei *A. flavus* erforderlich.

FISCHER (1941/42) stellte fest, daß in einer Nährlösung nach STEINBERG mit Stärke als C-Quelle der Quotient Stärkeverbrauch/Myzeltrockengewicht von der Spurenelementkonzentration abhängig ist. Bei Mangel oder Überschuß war der Quotient höher als bei Spurenelementzusätzen, welche maximale Myzelbildung ergaben. Der Effekt war für Cu am ausgeprägtesten und nahm in der Reihenfolge Zn, Mn, Fe ab.

In der zitierten Literatur finden sich bisher keine Untersuchungen über den Einfluß der Elemente Zn, Fe, Cu, Mn und Mg auf die Amylasebildung von *A. oryzae*.

MEYRATH (1957 b) stellte fest, daß die Amylasebildung auf Maltose, Dextrin oder Stärke als Kohlenstoffquelle je nach Handelspräparat verschieden ausfiel. Wurde jedoch ein bestimmtes Stärkepräparat mit einer Enzymlösung von *A. oryzae* teilweise oder vollständig hydrolysiert, so war die Amylaseausbeute mit der betreffenden Stärke und deren abgestuften Hydrolysaten unter sich gleich. MEYRATH vermutete deshalb, daß die unterschiedliche Amylaseausbeute bei C-Quellen verschiedener Herkunft auf Spurenelementeinflüssen beruhen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Spurenelemente Zn, Fe, Cu und Mn sowie des Makroelements Mg auf das Wachstum und die Bildung amylolytischer und proteolytischer Enzyme von *A. oryzae* untersucht. Ferner wurden Versuche über den Einfluß verschiedener C-Quellen bei definierten Spurenelementbedingungen ausgeführt. Voraussetzung für solche Versuche ist, wie bereits erwähnt, eine wirksame Reinigung der Nährlösungen von Spurenelementen. Im folgenden methodischen Teil werden deshalb verschiedene Reinigungsmethoden untereinander verglichen. Sodann werden die enzymatischen Bestimmungsmethoden erörtert. Zur Erreichung optimaler Amylaseausbeuten wurde schließlich dem Einfluß von pH und N-Quelle auf die Amylasebildung spezielle Beachtung geschenkt.

## II. Material und Methoden

### A. Organismen

*Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn. Der verwendete Stamm war in früheren Publikationen des Instituts mit dem Gruppennamen *A. flavus-oryzae*, Stamm II (vgl. MEYRATH 1957 a) bezeichnet worden. Herr Dr. E. MÜLLER vom Institut für spezielle Botanik der ETH bestimmte den Stamm als *A. oryzae*. Es sei ihm dafür an dieser Stelle bestens gedankt.

*Aspergillus niger* (van Tieghem, Mulder-Stamm) wurde vom Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn bezogen. MULDER (1939) verwendete diesen Stamm erstmals zur mikrobiologischen Bestimmung von Spurenelementen im Boden. Der M-Stamm erwies sich in den Arbeiten von NICHOLAS (1950) und DONALD et al. (1952) als empfindlicher Testorganismus für Spurenelementmangel und wurde deshalb auch in der vorliegenden Arbeit zur Prüfung der Reinigungstechnik beigezogen.

## B. Kulturmethoden

### 1. Impfmateriale und Impftechnik

Als Impfmateriale dienten Konidien von ca. 14-tägigen Bierwürze-Schrägagarkulturen. Um eventuellen Degenerationserscheinungen entgegenzuwirken, wurde von Zeit zu Zeit auf eine bei 0° aufbewahrte Stammkultur zurückgegriffen. Die Konidien wurden durch oberflächliches Abreiben einer Schrägagarkultur mit einer Platinöse in bidestilliertem sterilem Wasser suspendiert, durch Watte filtriert, um Myzel- und Agarteilchen abzutrennen, und anschließend 5—6 mal mit bidestilliertem Wasser durch Zentrifugieren gewaschen.

Die gewaschene Konidien suspension wurde nach dem Auszählen mit der Thomakammer so verdünnt, daß ein Tropfen ( $\frac{1}{20}$  ml) der Impfsuspension die gewählte Impfmeng e pro Kolben von ca.  $10^6$  Konidien enthielt.

Zusammensetzung des Bierwürzeagars: 500 ml ungehopfte Bierwürze von 16° Balling werden mit 500 ml Leitungswasser verdünnt und 20 g Agar zugesetzt.

### 2. Nährlösungen

Es wurden hauptsächlich die folgenden Nährlösungen verwendet:

Nährlösung A (nach DONALD et al. 1952): 50 g Saccharose (Handelsware), 5 g  $KNO_3$ , 2,5 g  $K_2HPO_4$ , 0,5 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 200  $\gamma$  Fe ( $FeCl_2 \cdot 6 H_2O$ ), 180  $\gamma$  Zn ( $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ ), 40  $\gamma$  Cu ( $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ ), 20  $\gamma$  Mn ( $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ ), 10  $\gamma$  Ca ( $CaCl_2$ ), 10  $\gamma$  Mo ( $(NH_4)_2MoO_4$ ), 10  $\gamma$  B ( $H_3BO_3$ ). Das pH wurde vor dem Autoklavieren mit HCl auf 7,5 eingestellt. Außer Saccharose wurden nur Reagenzien vom Reinheitsgrad „pro analysi“ (p. a.) verwendet.

Diese Nährlösung wurde mit *A. niger* für die Untersuchungen des folgenden Abschnittes über die Reinigungstechnik verwendet.

Nährlösung B: 15 g Maltose (puriss. Hoffmann-La Roche), 20 g  $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ , 20 g  $KH_2PO_4$ , 1,5 g  $(NH_4)_2HPO_4$ , 0,3 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 400  $\gamma$  Zn, 400  $\gamma$  Fe, 40  $\gamma$  Cu, 20  $\gamma$  Mn, 2  $\gamma$  Mo, Ca, B, ad 1 Liter mit Ionenaustauschwasser. pH = 6,0 mit HCl eingestellt.

Diese Nährlösung wurde in den Untersuchungen über den Einfluß von Spurenelementen auf Wachstum und Enzyymbildung von *A. oryzae* verwendet.

### 3. Durchführung der Kulturversuche

Die Züchtung erfolgte als Standkultur in 25 ml Nährlösung pro 100-ml-Erlenmeyerkolben in einem Brutraum bei 25° C. Die Kulturdauer geht jeweils aus den Tabellen oder Abbildungen hervor.

Die Nährlösungen wurden mit Meßpipetten abgefüllt, die Kolben mit Pfropfen aus langfaseriger, entfetteter Watte verschlossen und während 15 Min. bei 1 atü autoklaviert.

### 4. Bestimmung des Myzeltrockengewichtes

Das Myzel wurde mit einem Gazetuch über einer Porzellannutsche abfiltriert, mit 2—3 Güssen destilliertem Wasser gewaschen und während 24 Std. bei 105° C getrocknet.

### 5. Wasserstoffionenkonzentration

Alle pH-Werte wurden mit einer Glaselektrode gemessen.

## C. Reinigungstechnik

### 1. Allgemeines

#### a) Der „Nullwert“

Auf die Notwendigkeit, bei Spurenelementversuchen erst alle Spurenelemente zu entfernen und nachträglich die gewünschten in bekannter Konzentration zuzugeben, wurde in der Einleitung bereits hingewiesen. Nach KOCH und DÉDIC (1957 b) können Untersuchungen über Spurenelementeinflüsse ohne Anwendung einer besonderen Reinigungstechnik nur qualitative Anhaltspunkte liefern. Als Hauptargumente führen die genannten Autoren den Ionenantagonismus sowie die gegenseitige Ersetzbarkeit von Spurenelementen an.

Das Ziel der Reinigungstechnik ist die Schaffung möglichst spurenfreier Bedingungen. Sie umfaßt eine Methode zur Entfernung von Spurenelementen, welche in einer Nährlösung als Verunreinigungen enthalten sind sowie Maßnahmen zur bestmög-



lichen Ausschaltung weiterer Verunreinigungsquellen bei der Durchführung von Kulturversuchen. Es sei zum vornherein bemerkt, daß eine völlige Spurenfreiheit (Wachstum = 0) praktisch nicht erreicht werden kann. Als Maß des Reinigungseffekts für die einzelnen Spurenelemente dient der sogenannte Nullwert.

Werden einem geringigten Medium sämtliche, für optimales Wachstum erforderlichen Spurenelemente zugesetzt, mit Ausnahme desjenigen, dessen spezifischer Einfluß untersucht werden soll (Spurenelement S), so bezeichnet man den im Kulturversuch noch erreichten Myzelertrag als Nullwert für das betreffende Spurenelement S (vgl. z. B. KOCH und DÉDIC 1957 b). Das Ziel der Reinigungstechnik besteht also in möglichst tiefen Nullwerten für die einzelnen Spurenelemente.

Als relativer Nullwert eines Spurenelementes S gilt in der vorliegenden Arbeit der Quotient:

$$\frac{\text{Myzelertrag ohne Zusatz von S} \times 100}{\text{Myzelertrag bei optimaler Konzentration aller Spurenelemente}}$$

#### b) Literatur

Die erste Reinigungstechnik war die  $\text{CaCO}_3$ -Methode nach STEINBERG (1919). Seither wurden zahlreiche andere Reinigungsmethoden beschrieben (Übersicht: FOSTER 1949). DONALD et al. (1952) führte einen Vergleich über die Reinigungswirkung von 38 verschiedenen Methoden zur gleichzeitigen Entfernung von Zn, Fe, Cu, Mn und Mo aus. Als Testorganismen dienten Stämme von *A. niger*, u. a. der Mulder (M)-Stamm.

Nach der genannten Autorin erwies sich als wirksamste Methode das Autoklavieren der Nährlösung A mit 5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  pro Liter. Mit ihr erreichte sie bei einem Myzelertrag von 430 mg/25 ml Medium mit optimalen Spurenelementkonzentrationen die folgenden relativen Nullwerte: 2% für Zn, 5% für Fe, 33% für Cu, 36% für Mn, 42% für Mo. Durch kombinierte Extraktion mit Dithizon und Oxin ließen sich ebenso tiefe Nullwerte für Zn und Fe erzielen, während diejenigen für Cu (49%) und Mn (55%) etwas höher ausfielen. Aus den vergleichenden Untersuchungen von DONALD et al. (l. c.) geht ferner hervor, daß es auch mit anderen Methoden im allgemeinen leicht gelingt, tiefe Nullwerte für Zn und Fe zu erhalten, während dies für Cu und Mn ungleich schwieriger ist. Die nach der Literatur bisher tiefsten Nullwerte für die letztgenannten Elemente erreichte NICHOLAS (1950) durch Sulfidfällung. Seine Ergebnisse konnten jedoch von DONALD et al. (l. c.) nicht reproduziert werden.

#### c) Eigene Versuche

Auf Grund der Vergleichsversuche von DONALD et al. (l. c.) wurde für die eigenen Untersuchungen zunächst die  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Methode als Reinigungsmethode ausgewählt. Hierbei ergaben sich zwei Schwierigkeiten:

1. Bei Verwendung der gleichen Nährlösung (Nährlösung A) und des gleichen Testorganismus (*A. niger*, Mulder-Stamm) ließen sich in unserem Laboratorium die von DONALD et al. erzielten Nullwerte für Zn und Fe ohne weiteres reproduzieren, nicht aber diejenigen für Cu und Mn. Es wurde daher versucht, durch verschiedene Modifikationen der Reinigungsmethode tiefere Nullwerte für Cu und Mn zu erhalten. Nachdem dies nur teilweise gelang (s. nächster Abschnitt), wurde systematisch eine Reihe weiterer Faktoren untersucht, die als Quelle von Verunreinigungen mit Spurenelementen in Frage kommen (s. übernächster Abschnitt). Es sind dies:

- Reinigung, Material und Verschlusart der Kulturkolben,
- Wasserqualität,
- Reinheitsgrad der für den Spurenelementzusatz verwendeten Chemikalien,
- Impfmateriale.

2. Nährlösung A mit Saccharose als C-Quelle, Nitrat als N-Quelle und relativ schwacher Pufferung ist für Versuche über Amylasebildung durch *A. oryzae* ungeeignet. Zu diesem Zweck wurde in Versuchen, die in Kapitel E dargestellt sind, Nährlösung B entwickelt. Die Behandlung dieser Nährlösung mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  führte nun aber zu starker Braunfärbung und Ausfällung von Phosphat. Es mußte daher für die enzymatischen Versuche eine andere

Reinigungsmethode gewählt werden. Als geeignet erwies sich die Extraktionsmethode mit Dithizon und Oxin als komplexbildenden Reagenzien nach KOCH und DÉDIC (1957 b) (s. 6. Abschnitt). Einige Versuche wurden ferner über separate Reinigung der C-Quelle mit Hilfe von Ionenaustauschern ausgeführt (s. 7. Abschnitt).

#### d) Statistische Auswertung

In den Tabellenwerten bedeutet  $s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$ .

Wo keine Streuung angegeben ist, wurde das Myzel der Parallelkolben wegen des geringen Einzelgewichts gemeinsam geerntet und gewogen.

Es sei darauf hingewiesen, daß Unterschiede der Nullwerte in den vorliegenden Untersuchungen über die Reinigungstechnik nirgends als signifikant bezeichnet werden können. Eine statistische Auswertung wäre bei der geringen Anzahl von Parallelen, den großen Streuungen, die sich in Spurenelementversuchen kaum vermeiden lassen und den modifikationsbedingten Änderungen des Myzelertrages bei den kompletten Medien höchstens von theoretischem Wert. Dennoch können die erhaltenen Unterschiede Hinweise von praktischer Bedeutung für die Reinigungstechnik bieten<sup>1)</sup>.

#### 2. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - Methode

Ausführung nach DONALD et al. (1952): 1 Liter der Nährlösung A wird mit 5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (British Drug Houses Ltd., „zur chromatographischen Analyse“) versetzt, das Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> durch Schütteln oder Schwenken gut suspendiert, das Gemisch während 20 Min. bei 1 atü autoklaviert, unmittelbar nach dem Autoklavieren das Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> wiederum durch Schütteln suspendiert und das Ganze nach Stehenlassen über Nacht bei 0° C über eine Glasfritte filtriert, welche mittels Schliff mit einer Saugflasche verbunden ist (Fritte und Saugflasche aus Pyrexglas).

Der filtrierten Nährlösung werden hierauf die Spurenelemente als p. a. Reagenzien beigefügt (der Zusatz erfolgte aus zusammengestellten Stammlösungen, welche pro ml alle erwünschten Spurenelemente in der angegebenen Konzentration enthielten). Nach dem Abfüllen der Nährlösung in die Kulturkolben werden diese mit Wattepfropfen verschlossen, autoklaviert und mit einem Tropfen der beschriebenen Kondiensuspension geimpft.

Die Kulturkolben sowie alle übrigen verwendeten Glaswaren wurden während je 12 Std. in kalte Chromsäure bzw. Salzsäure eingelegt und hierauf mit heißem Leitungswasser, Ionenaustauscherwasser und schließlich noch mit redestilliertem Ionenaustauscherwasser gründlich gespült. Für die Wasserdestillation stand eine Pyrex-Apparatur mit Quarzglas-Destillieraufsatz zur Verfügung.

Die Nullwerte für Zn, Fe, Cu und Mn sowie der Myzelertrag ohne Zusatz irgendwelcher Spurenelemente (Bezeichnung = 0), die nach der beschriebenen Methode erhalten wurden, sind in Tab. I als Variante a aufgeführt. (MTG = Myzeltrockengewicht bei Zusatz aller Spurenelemente.)

Wie man sieht, wurden für Zn und Fe Nullwerte erreicht, die den Angaben von DONALD et al. (1952) entsprechen. Dagegen ist der Cu-Nullwert um 30%, der Mn-Nullwert sogar um 50% höher ausgefallen als bei DONALD et al. (l. c.).

Um möglicherweise die Cu- und Mn-Nullwerte weiter zu senken, wurde die beschriebene Methode folgendermaßen modifiziert:

Variante b): Zweimaliges Autoklavieren mit 5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Liter.

Eine gereinigte Nährlösung wurde nochmals mit 5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> versetzt und die Reinigung wiederholt.

Variante c): Doppelt konzentrierte Nährlösung. Die Reagenzien für Nährlösung A wurden in 500 ml Wasser gelöst und zusammen mit 5 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> auto-

<sup>1)</sup> Ich bin Herrn Prof. Dr. H. L. LE ROY vom Institut für Tierzucht an der ETH für die dargelegte Beurteilung der Untersuchungsergebnisse im Abschnitt Reinigungstechnik zu Dank verpflichtet.

klaviert. Nach der Filtration wurde mit bidestilliertem Wasser auf übliche Konzentration verdünnt.

Variante d): Erhöhung des  $Al_2O_3$ -Zusatzes.

Eine doppelt konzentrierte Nährlösung nach Variante c) wurde mit 10 g  $Al_2O_3$  autoklaviert.

Die Ergebnisse dieser Modifikationen sind in Tab. I zusammengestellt.

Tab. I. Wirksamkeit der  $Al_2O_3$ -Methode und einiger Modifikationen auf die gleichzeitige Entfernung von Zn, Fe, Cu und Mn aus Nährlösung A

Variante		Nullwerte für					Myzelertrag bei Zusatz aller Spurenelemente MTG
		0	Zn	Fe	Cu	Mn	
a	mg/25 ml	1,8	5,2	4,3	217,3	318,9	351,7
	$\bar{s}_x$	—	—	—	5,9	3,2	16,8
	% MTG	0,4	1,5	1,2	62	90	100
b	mg/25 ml	1,2	2,9	3,5	170,9	251,9	260,3
	$\bar{s}_x$	—	—	—	3,1	2,2	1,8
	% MTG	0,5	1,1	1,4	65	96	100
c	mg/25 ml	1,8	5,1	5,2	213,9	344,9	400,2
	$\bar{s}_x$	—	—	—	3,2	7,5	5,8
	% MTG	0,4	1,3	1,3	53	86	100
d	mg/25 ml	2,3	3,6	4,8	190,0	348,6	406,7
	$\bar{s}_x$	—	—	—	3,5	3,1	8,2
	% MTG	0,6	0,8	1,2	47	86	100

Nährlösung A, Kulturdauer 7 Tage, Variante a und b je vier Parallelen, Variante c und d je drei Parallelen. *A. niger*, M-Stamm. MTG = Myzeltrockengewicht.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. I. Die niedrige Myzelausbeute in Variante b deutet darauf hin, daß bei zweimaligem Autoklavieren gewisse Makrobestandteile der Nährlösung verlorengehen oder daß vermehrt Hemmstoffe gebildet werden. Die relativen Nullwerte liegen eher höher als in Variante a; also keine Verbesserung des Reinigungseffekts. Hingegen läßt sich bei Anwendung einer doppelt konzentrierten Nährlösung (Variante c), sowie höherer  $Al_2O_3$ -Gabe (Variante d) die Tendenz einer besseren Reinigungswirkung erkennen. Der relative Nullwert für Cu konnte gegenüber Variante a um 15%, derjenige für Mn um 4% reduziert werden.

In einem weiteren Versuch wurde ein Medium mit 5 g  $Al_2O_3$ /Liter während 40 Min. im Dampftopf erhitzt und das abgesetzte  $Al_2O_3$  jeweils in Intervallen von 5 Min. durch Schütteln wiederum suspendiert. Die Nullwerte für Cu und Mn konnten jedoch dadurch nicht weiter gesenkt werden. Auch die Filtration des autoklavierten Mediums über eine auf der Glasfritte aufgeschwemmte  $Al_2O_3$ -Schicht ergab keinen besseren Reinigungseffekt. Durch die zusätzliche  $Al_2O_3$ -Schicht auf der Glasfritte wurde jedoch die leichte Opaleszenz, welche das Filtrat sonst immer zeigte, beseitigt. Damit war gleichzeitig eine analoge Verminderung der Myzelausbeute verbunden, wie in Variante b Tab. I.

In einer weiteren Versuchsserie zeigte sich, daß die tieferen Myzel- ausbeuten bei der beschriebenen Modifikation einem Mg-Verlust zuzuschreiben sind. Die in Tab. 2 zusammengestellten Ergebnisse basieren auf folgenden Versuchsanordnungen:

- Variante e: 750 ml Nährlösung A mit 5 g  $Al_2O_3$  autoklaviert und über eine  $Al_2O_3$ -Schicht filtriert. Nach dem Autoklavieren Zusatz von 250 ml Wasser.
- Variante f: wie e, aber ohne  $MgSO_4$ . Nach der Filtration Zusatz von 0,3 g  $MgSO_4$  (durch Extraktion gereinigt) in 250 ml Wasser.
- Variante g: wie e, aber doppelte Zusätze an  $MgSO_4$  und  $K_2HPO_4$  vor dem Autoklavieren. Nach der Filtration Zusatz von 0,3 g  $MgSO_4$  in 250 ml Wasser.
- Variante h: wie g, aber mit vierfachem Zusatz von  $MgSO_4$  und  $K_2HPO_4$  vor dem Autoklavieren.

Tab. 2. Einfluß von Mg-Zusatz nach dem Autoklavieren auf die Myzelausbeute. Einfluß steigender  $MgSO_4$ - und  $K_2HPO_4$ -Gaben auf die Nullwerte

Variante		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
e	mg/25 ml	3,4	5,2	6,9	112,0	270,4	267,0
	$\bar{s}_x$	—	—	—	0,9	2,8	3,4
	% MTG	1,3	1,9	2,6	42	101	100
f	mg/25 ml	2,3	1,4	17,2	185,2	286,8	330,6
	$\bar{s}_x$	—	—	—	9,6	4,3	10,7
	% MTG	0,7	0,4	5,2	56	87	100
g	mg/25 ml	4,0	3,8	7,9	155,5	274,8	356,0
	$\bar{s}_x$	—	—	—	1,7	3,3	3,3
	% MTG	1,1	1,1	2,2	44	77	100
h	mg/25 ml	4,0	3,1	12,0	161,0	268,5	346,5
	$\bar{s}_x$	—	—	—	5,2	2,8	6,5
	% MTG	1,1	0,8	3,5	46	77	100

Nährlösung A, Kulturdauer 6 Tage, vier Parallelen. *A. niger*, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse in Tab. 2. Der Vergleich von Variante e und f zeigt, daß durch Zusatz von  $MgSO_4$  nach dem Autoklavieren die Myzelausbeute um 12% erhöht wird. Aus dem Vergleich der Nullwerte geht ferner hervor, daß es nicht ohne Einfluß auf die Reinigungswirkung der Methode ist, ob das  $MgSO_4$  vor oder nach dem Autoklavieren zugegeben wird. In Variante g und h wurde deshalb versucht, durch gleichzeitige Erhöhung der  $MgSO_4$ - und  $K_2HPO_4$ -Gaben und des daraus resultierenden erhöhten Mg-Phosphatniederschlages beim Autoklavieren mit  $Al_2O_3$  einen günstigen Reinigungseffekt zu erzielen. Die Reinigung von Kulturmedien mittels eines Niederschlages von Mg-Phosphat ist ja bekannt (ELVEHJEM 1931).

Gegenüber Variante f konnten durch die höheren Mg- und Phosphatzusätze der Cu-Nullwert der Varianten g und h um 8% bzw. 6%, der Mn-Nullwert um 10% gesenkt werden.

Als weitere Varianten wurde die Reinigungswirkung von  $Al_2O_3$  verschiedener Herkunft (British Drug Houses, Merck, Woelm) verglichen (Tab. 3).

Tab. 3. Reinigungswirkung von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> verschiedener Herkunft

	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
mg/25 ml	BDH	2,8	7,4	21,3	217,4	268,2	400,7
$\bar{s}_x$		—	—	—	3,9	4,5	4,6
% MTG		0,7	1,8	5,3	54	67	100
mg/25 ml	Merck	2,0	6,7	13,8	219,4	248,9	422,5
$\bar{s}_x$		—	—	—	0,3	9,0	2,5
% MTG		0,5	1,6	3,3	52	59	100
mg/25 ml	Woelm	5,5	10,1	12,3	228,6	230,5	420,7
$\bar{s}_x$		—	—	—	8,0	9,8	6,2
% MTG		1,3	2,4	2,9	54	55	100

Nährlösung A, Kulturdauer 7 Tage, Durchschnitt aus vier Parallelen. *A. niger*, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse in Tab. 3. Die absoluten Nullwerte für Fe, Cu und vor allem für Mn fielen mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> BDH höher aus als mit den Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> von Merck und Woelm.

Der relative Mn-Nullwert mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> von Woelm war um 12%, mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> von Merck um 8% niedriger als mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> BDH. Die Unterschiede der relativen Cu-Nullwerte sind unbedeutend (2%). Hingegen dürfte der um 2% höhere Fe-Nullwert mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> BDH ins Gewicht fallen.

### Zusammenfassung

Die erreichten Nullwerte für Zn und Fe entsprechen den Angaben von DONALD et al. (1952) oder liegen z. T. noch tiefer. Die für Cu und Mn angegebenen Nullwerte konnten dagegen weder nach der Methode von DONALD et al. (Tab. 1, Var. a) noch mit den geprüften Modifikationen reproduziert werden. Der günstigste Cu-Wert (Tab. 2, Var. e) lag um 11%, der günstigste Mn-Wert (Tab. 3, Woelm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) lag um 19% über den relativen Nullwerten von DONALD et al. (l. c.).

Es fragt sich, welche Unterschiede in der Versuchstechnik hierfür verantwortlich sind. Die bisher beschriebenen Versuche wurden mit 25-ml-Kolben aus Jenaer Glas G 20 mit Wattebausch als Verschuß ausgeführt, während DONALD et al. mit 100-ml-Kolben aus Pyrexglas und Bechergläsern als Verschuß arbeitete. Als nächstes war also Glasqualität und Art des Verschlusses zu untersuchen. Ferner wäre möglich, daß DONALD et al. reineres Wasser herstellen konnte als das hier benutzte. Schließlich war zu prüfen, ob trotz Verwendung des gleichen Pilzstammes und prinzipiell gleicher Impftechnik nicht doch Unterschiede in der Beschaffenheit des Inoculums die ausschlaggebende Rolle spielten. Einer Untersuchung dieser Faktoren sind die folgenden Abschnitte gewidmet.

### 3. Einfluß der Reinigung, des Materials und des Verschlusses der Kulturgefäße auf die Nullwerte

#### a) Reinigungsart

In der Literatur werden für die spezielle Reinigung der Kulturkolben und übrigen Glaswaren folgende Behandlungen in der jeweils angegebenen Reihenfolge vorgeschlagen: Kochende 6 n HCl — Leitungswasser — dest. Wasser — bidest. Wasser (KOCH und

DÉDIC 1957 b). Organisches Reinigungsmittel — bidest. Wasser (NICHOLAS 1950). Einlegen in Königswasser — bidestilliertes Wasser (DONALD et al. 1952), (SPICHER 1954). Heiße Chromschwefelsäure — Leitungswasser — bidest. Wasser (SANDELL 1954). Salpetersäure — Ammoniakwasser — Dithizon in Chloroform gelöst — bidest. Wasser (IWANTSCHOFF 1958).

Reinigungsgang für die eigenen Untersuchungen: 12 Std. Einlegen in Chromsäure — 12 Std. Einlegen in Salzsäure, hierauf gründliche Spülung mit heißem Leitungswasser — Ionenaustauscherwasser — redest. Ionenaustauscherwasser.

Der Einfluß folgender Modifikationen wurde untersucht:

Variante a: Reinigung wie oben beschrieben.

Variante b: nach a gereinigte Kolben werden mit bidest. Wasser aufgefüllt und unter Watteverschluß während 1 Std. bei 1 atü autoklaviert.

Variante c: Reinigung wie a.

Variante d: Reinigung wie a — Kolben zusätzlich während 2 Std. mit heißer HCl behandelt — gründlich gespült mit redest. Ionenaustauscherwasser.

Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt. Es sind nur die Varianten a und b einerseits und c und d andererseits vergleichbar (gleiche Versuchsserie).

Tab. 4. Einfluß verschiedener Reinigungsarten

Variante		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
a	mg/25 ml	5,2	13,0	13,4	203,2	228,9	310,5
	$\bar{s}_x$	—	—	—	7,0	27,1	9,5
	% MTG	1,7	4,2	4,3	65	74	100
b	mg/25 ml	5,8	13,0	13,2	206,0	255,4	291,7
	$\bar{s}_x$	—	—	—	6,0	4,0	0,3
	% MTG	2,0	4,5	4,5	70	88	100
c	mg/25 ml	—	—	—	138,6	251,1	317,4
	$\bar{s}_x$	—	—	—	2,8	2,5	2,7
	% MTG	—	—	—	43	79	100
d	mg/25 ml	—	—	—	140,5	269,7	317,4
	$\bar{s}_x$	—	—	—	2,9	3,0	2,7
	% MTG	—	—	—	44	85,0	100

Nährlösung A, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gereinigt, Kulturdauer 7 Tage. Variante a und b zwei, Variante c und d sechs Parallelen. *A. niger*, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 4. Aus dem Vergleich der Nullwerte von Variante a und b geht hervor, daß durch das Autoklavieren der Kulturkolben mit redest. Ionenaustauscherwasser nach erfolgter Reinigung kein positiver Reinigungseffekt erzielt werden konnte. Die relativen Nullwerte von Variante b liegen für Cu um 5%, für Mn sogar um 14% höher. Durch das Autoklavieren erfolgt also keine bessere Ablösung der Spurenelemente von den Glaswandungen als bei gründlicher Spülung mit der gleichen Wasserqualität. Die zusätzliche Behandlung der Kolben mit heißer 5 n HCl bewirkte ebenfalls eine Erhöhung der relativen Nullwerte (1% für Cu, 6% für Mn) gegenüber der nach üblicher Art gereinigten Kolbenserie (Var. c), obwohl redest. p. a. HCl verwendet wurde. Es erübrigt sich demzufolge, eine Behandlung mit heißer HCl in den Reinigungsgang der Kulturgefäße einzuschalten.

b) Material der Kulturgefäße

Nach JAVILLIER (1914) und ROBERG (1928) sollen mit Kulturkolben aus Quarzglas tiefere Nullwerte erreicht werden als mit Gefäßen aus Pyrex oder Jenaer G 20. GALLMICK (1936) stellte fest, daß nach achttägiger Kulturdauer der Myzelertrag in Versuchsserien mit Quarz- und Jenaer Glasgefäßen nicht verschieden war, jedoch nach 24 Tagen in den Jenaer Kolben um den doppelten Betrag höher ausfiel als in den Quarzkolben. Nach WASSILJEW (1935) waren in Versuchsserien mit Kolben aus Jenaer G 20 und Pyrex keine Unterschiede in den Nullwerten festzustellen. DOZER (1952) konnte zeigen, daß Kunststoffbehälter geringere Mengen Spurenelemente an Lösungen abgeben als Gefäße aus Hartglas. SPICHER (1954) schlägt vor, Silikone als Glasüberzug zu verwenden, um die Spurenelementabgabe zu verringern.

Es wurde untersucht, ob Erlenmeyerkolben aus Pyrex-Glas oder Rollflaschen aus Polyäthylen gegenüber Gefäßen aus Jenaer Glas G 20 Vorteile bieten. Die Prüfungen umfaßten:

- a) einen Vergleich über Cu- und Mn-Abgabe von Jenaer G 20- und Pyrexkolben,
- b) einen Vergleich über Zn-, Fe-, Cu- und Mn-Abgabe von Erlenmeyerkolben aus Jenaer G 20 und Rollflaschen aus Polyäthylen.

Für die in Tab. 5 zusammengestellten Ergebnisse gilt folgende Versuchsanordnung:

- Variante a: Erlenmeyerkolben aus Jenaer G 20.
- Variante b: Erlenmeyerkolben aus Pyrex.
- Variante c: Erlenmeyerkolben aus Jenaer G 20 (Standkultur).
- Variante d: Erlenmeyerkolben aus Jenaer G 20 (Schüttelkultur).
- Variante e: Rollflaschen aus Polyäthylen (Schüttelkultur).

Es sind einerseits die Varianten a und b, andererseits die Varianten c, d und e vergleichbar (gleiche Versuchsserie). Die Schüttelkultur wurde bei Variante d und e gewählt, um die Unterschiede der Nährlösungsschichthöhe, welche durch den verschiedenen Durchmesser der Bodenflächen von Erlenmeyerkolben (6,0 cm) und Rollflaschen (4,8 cm) bedingt war, auszugleichen (Schüttelfrequenz: 80 Hin- und Herbewegungen/Min. Amplitude: 4 cm).

Tab. 5. Verwendung von Gefäßen aus Jenaer G 20, Pyrex und Polyäthylen im Kulturversuch

Variante		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
a	mg/25 ml	—	—	—	138,6	251,1	—
	$s_{\bar{x}}$	—	—	—	3,1	2,5	—
b	mg/25 ml	—	—	—	186,6	265,0	—
	$s_{\bar{x}}$	—	—	—	3,2	4,9	—
c	mg/25 ml	1,8	5,1	5,2	213,8	344,9	400,2
	$s_{\bar{x}}$	—	—	—	4,7	7,5	5,8
	% MTG	0,4	1,3	1,3	53	86	100
d	mg/25 ml	10,8	25,0	10,3	88,9	148,9	154,4
	$s_{\bar{x}}$	—	—	—	4,5	28,1	9,9
	% MTG	7,0	16,2	6,7	57	96,0	100
e	mg/25 ml	3,1	17,1	7,5	113,3	152,0	115,6
	$s_{\bar{x}}$	—	—	—	1,0	3,9	6,6
	% MTG	2,7	15,0	6,5	98	131	100

Kulturdauer: Variante a, b, c = 7 Tage, Variante d, e = 5 Tage. Nährlösung A, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-gereinigt. Variante a und b Durchschnitt von sechs, Variante c, d, e Durchschnitt von drei Parallelen. A. niger, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 5. Aus dem Vergleich von Variante a und b geht hervor, daß die verwendeten Pyrexkolben besonders mehr Cu, aber auch mehr Mn an die Nährlösung abgaben als die Jenaer Kolben.

Der Vergleich von 100-ml-Jenaer Kolben mit 125-ml-Rollflaschen aus Polyäthylfen fiel betreffend Cu- und Mn-Abgabe ebenfalls zugunsten des Jenaer Glases aus, während das Polyäthylfenmaterial betreffend Zn- und Fe-Abgabe vorteilhafter erscheint.

Merkwürdigerweise war in der Polyäthylfenserie der Mn-Nullwert höher als der Myzelertrag im kompletten Medium. Ferner übertraf der Myzelertrag im kompletten Medium der Jenaer Kolbenserie den der Polyäthylfenserie. Es wäre denkbar, daß dieser Effekt durch die höhere Flüssigkeitsschicht in den Rollflaschen bedingt war.

In der gleichen Versuchsserie werden mit Standkulturen (c) tiefere relative Nullwerte erreicht als mit Schüttelkulturen (d). Entweder können noch vorhandene Spurenelemente in Schüttelkulturen besser ausgenutzt werden, oder es werden mehr Spurenelemente vom Glas abgegeben, da ja ein ungleich größerer Teil der Gefäßwänden benetzt wird.

Besonders auffallend ist ferner der höhere Myzelertrag im kompletten Medium der Standkultur verglichen mit demjenigen der Schüttelkultur.

#### c) Verschlussart der Kulturkolben

Nach STAPP und WETTER (1953) können die in die Nährlösung fallenden Fasern von Wattepfropfen eine Verunreinigungsquelle darstellen. Häufig werden deshalb in Spurenelementversuchen an Stelle von Wattebüschchen als Kolbenverschluss kleine Bechergläser verwendet, die über den Kolbenhals gestülpt werden (DONALD et al. 1952, SPICHER 1954). Nach KOCH und DÉDIC (1957 b) ergibt sich bei Verwendung von Wattepfropfen eine maximal mögliche Verunreinigung von 40  $\gamma$  Baumwollwattefäden/Kultur. Durch spektrochemische Bestimmung des Spurenelementgehaltes von Baumwollwatte gelangen sie zur Ansicht, daß diese Verunreinigungsquelle vernachlässigt werden darf.

In Tab. 6 sind die Nullwerte zweier Kolbenserien aufgeführt, die

a) mit Wattepfropfen verschlossen,

b) denen Bechergläser aus Jenaer G 20 übergestülpt wurden.

Tab. 6. Vergleich von Watte- und Becherglasverschluss

Variante		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
a	mg/25 ml	6,5	3,6	22,0	253,4	386,1	436,3
	$\bar{s}_x$	—	—	—	1,4	3,2	4,1
	% MTG	1,5	0,8	5,0	58	88	100
b	mg/25 ml	4,9	6,2	20,3	265,4	372,6	392,0
	$\bar{s}_x$	—	—	—	4,9	2,2	6,3
	% MTG	1,2	1,6	5,1	68	95	100

Nährlösung A, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-gereinigt, Kulturdauer 7 Tage, Durchschnitt von drei Parallelen, *A. niger*, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 6. Die Nullwerte für Cu und Mn konnten durch den Becherglasverschluss gegenüber dem Watteverschluss nicht gesenkt werden. Die relativen Nullwerte der genannten Elemente fielen sogar in der Becherglasserie um 10% bzw. 7%



höher aus als in der Watteserie. Die Zn- und Fe-Nullwerte zeigten keine Unterschiede. Es fällt auf, daß im kompletten Medium der Watteserie ein höherer Myzelertrag erreicht wurde als in der Becherglasserie.

#### 4. Die Wasserqualität

Das Wasser, das zum Spülen der Kulturkolben und der übrigen Glaswaren sowie zur Herstellung von Spurenelementlösungen und Impfsuspensionen verwendet wird, kann eine Verunreinigungsquelle darstellen.

Der Zweck der Untersuchungen dieses Abschnitts bestand darin, mit den gegebenen Apparaturen ein möglichst spurenelementarmes Wasser zu gewinnen, um die daher stammenden Verunreinigungen einzuschränken.

Aus der Literatur geht hervor, daß am häufigsten bidestilliertes Wasser aus einer Hartglasapparatur verwendet wird (vgl. z. B. KOCH und DÉDIC 1957 b). NICHOLAS (1952) stellte durch mikrobiologische Bestimmung mit *A. niger* fest, daß das Bidestillat aus einer Pyrex-Apparatur noch 0,5  $\gamma$  Zn, 0,2  $\gamma$  Fe, 0,1  $\gamma$  Cu und 0,2  $\gamma$  Mn pro 100 ml enthielt. Dieser Metallgehalt ließ sich durch eine dritte Destillation nicht mehr weiter reduzieren. Nach einem Prospekt der „Elga Products Ltd. London“ kann bei Verwendung von Quarzglasapparaturen der Widerstand eines Bidestillats von 2 000 000 Ohm/cm durch 28 weitere Destillationen nur auf 28 000 000 Ohm/cm erhöht werden, während mit Ionenaustauschern eine Wasserqualität erzielt wird, die hinsichtlich Widerstand dem Tridestillat einer Quarzglasapparatur entspricht. IWANTSCHIEFF (1958) erachtet eine Redestillation von Ionenaustauscherwasser als notwendig, da dasselbe stets abgelöste feinste Harzteilchen enthalten soll, welche Metallionen tarnen und später abgeben können.

Für die eigenen Untersuchungen stand als Ausgangswasser das Eluat eines Gemischtbettaustauschers (Dowex 50/Dowex 2) zur Verfügung.

Um abzuklären, ob sich der Spurenelementgehalt des Ausgangswassers durch Destillation reduzieren ließe, wurde die Nährlösung B einerseits mit Ionenaustauscherwasser, andererseits mit dem Bidestillat desselben hergestellt und der Spurenelementgehalt der beiden ungereinigten Nährlösungen im Kulturversuch verglichen. Zur Herstellung des Bidestillats diente eine kombinierte Hartglasapparatur: Kolben und Kühler aus Pyrex, Aufsatz (nach WIGRET) und Überlauf aus Quarz, Auffangstutzen aus Jenaer G 20. Das Bidestillat wird in Behältern aus Jenaer G 20 aufbewahrt.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tab. 7. Vergleich der „Nullwerte“ von zwei ungereinigten Nährlösungen (B): a) mit Ionenaustauscherwasser, b) mit dem Bidestillat desselben hergestellt

Variante		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
a	mg/25 ml	88,5	77,7	121,2	126,5	123,1	137,6
	s <sub>x</sub>	3,1	2,7	0,2	1,4	1,2	7,9
	% MTG	64	56	88	92	89	100
b	mg/25 ml	49,8	42,7	119	99,7	123,8	121,1
	s <sub>x</sub>	1,7	2,5	2,7	3,3	1,1	0,4
	% MTG	41	35	98	82	102	100

Nährlösung A, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-gereinigt. Kulturdauer 6 Tage, Durchschnitt von vier Parallelen. *A. niger*, M-Stamm.

Tab. 7 zeigt, daß das zur Verfügung stehende Ionenaustauscher-Wasser durch zweimalige Destillation mit einer Hartglasapparatur spurenärmer wird. In der mit dem Ausgangswasser hergestellten Nährlösung wird ohne Spurenelementzusatz ein Myzelertrag von 88,5 mg/25 ml erreicht gegenüber einem Myzelertrag von 49,8 mg/25 ml mit Bidestillat. Die einzelnen Nullwerte zeigen, daß das Bidestillat vor allem weniger Zn und Cu enthält als das Ausgangswasser.

In einem weiteren Versuch wurde das eigene Bidestillat mit demjenigen einer entlehnten Heraeus-Apparatur (Hanauer Quarzglas) verglichen. Bei dieser Apparatur wird das Ausgangswasser mit einem Gemisch aus Anionen- und Kationenaustauscher entsalzt und anschließend zweimal destilliert. Das Bidestillat der Heraeus-Apparatur wurde in Polyäthylenbehältern aufbewahrt.

Die Kulturkolben sowie alle übrigen benötigten Glasgeräte, wie Pipetten, Meßzylinder usw., wurden vor ihrer Verwendung mit Wasser der entsprechenden Qualität gespült. Die Spurenelementzusätze erfolgten aus den gleichen, mit dem eigenen Bidestillat hergestellten Standardlösungen. Für die Herstellung der Impfsuspension wurde ebenfalls das eigene Bidestillat verwendet. Der Einfluß der beiden „Spülwasser“-Qualitäten geht aus Tab. 8 hervor.

Tab. 8. Vergleich des eigenen Bidestillats (a) mit demjenigen einer entlehnten Heraeus-Apparatur (b). (Spülwasser)

Variante		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
a	mg/25 ml	1,9	3,4	4,2	221,5	271,5	360,2
	$\overline{s\bar{x}}$	—	—	—	2,3	4,7	1,0
	% MTG	0,5	1,0	1,2	61	75	100
b	mg/25 ml	4,9	5,0	6,1	209,6	250,2	344,0
	$\overline{s\bar{x}}$	—	—	—	5,0	0,2	5,2
	% MTG	1,4	1,5	1,8	61	72	100

Nährlösung A, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-gereinigt. Kulturdauer 6 Tage, Durchschnitt aus zwei Parallel-*len*. A. *niger*, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 8. Die relativen Nullwerte der beiden Serien sind praktisch nicht verschieden. Die Senkung des Mn-Nullwertes von 3% bei Verwendung von Heraeus-Wasser ist nicht von Bedeutung. Als Spülwasser stellt also das eigene Bidestillat gegenüber demjenigen der Heraeus-Apparatur keine größere Verunreinigungsquelle dar.

## 5. Spurenelemente

Die Spurenelemente werden den gereinigten Nährlösungen gewöhnlich als Lösungen von p. a.-Reagenzien in bidestilliertem Wasser zugesetzt.

DONALD et al. (1952) verwendete umkristallisierte Spurenelemente. Um reinste Spurensalze zu gewinnen, extrahiert NICHOLAS (1952) Lösungen von CuSO<sub>4</sub> und ZnSO<sub>4</sub> mit Dithizon in Tetrachlorkohlenstoff. FeCl<sub>3</sub> wird vom gleichen Autor durch Extraktion mit Äther gereinigt. KOCH und DÉDIC (1957 b) sind der Ansicht, daß eine Umkristallisation oder anderweitige Reinigung von Spurensalzen nicht nötig sei, da Verunreinigungen derselben quantitativ zu unbedeutend seien, um sich auf die Nullwerte auszuwirken.

Zn und Fe sind diejenigen Spurenelemente, welche in größter Konzentration einer Nährlösung zugesetzt werden müssen. Die Salze dieser beiden Elemente stellen also am ehesten eine Verunreinigungsquelle dar. Es sollte deshalb untersucht werden, ob sich durch zweimalige Umkristallisation der p.a.-Reagenzien für Zn und Fe in bidest. Wasser die Nullwerte von Cu und Mn reduzieren ließen (vgl. Tab. 9).

Tab. 9. Einfluß der Umkristallisierung von  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  auf die Nullwerte von Cu und Mn

		Nullwerte für		MTG
		Cu	Mn	
Qualität p. a.	mg/25 ml	331,6	340,2	411,0
	$\bar{s}_x$	11,3	3,1	3,0
	% MTG	80	83	100
2× um- kristallisiert	mg/25 ml	315,7	317,5	410,4
	$\bar{s}_x$	19,0	2,6	3,4
	% MTG	77	77	100

Nährlösung A,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -gereinigt, Kulturdauer 6 Tage, Durchschnitt aus vier Parallelen. *A. niger*, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 9. In der Serie mit umkristallisiertem  $\text{FeCl}_3$  und  $\text{ZnSO}_4$  ist der relative Cu-Nullwert um 3% (15,9 mg), der relative Mn-Nullwert um 6% (22,7 mg) tiefer als in der Vergleichsserie mit p. a. Salzen. In der Folge wurden deshalb die umkristallisierten Salze der beiden Elemente verwendet.

## 6. Impfmaterial

Es ist bei Spurenelementversuchen allgemein üblich, Konidien als Impfmaterial zu verwenden. Dabei sollte das Übertragen von Nährbodenbestandteilen der Vorkultur mit den Konidien in die gereinigte Nährlösung vermieden werden. Bei der gewählten Impftechnik wurde deshalb die Konidien-suspension filtriert und mit bidest. sterilem Wasser gewaschen.

In der Literatur findet man folgende Impfmethode: Direkte Übertragung von Konidien mit der Öse von einer Schrägagarkultur in die Kolben mit gereinigter Nährlösung (z. B. NICHOLAS 1950). Die Konidien werden mit der Öse vom Schrägagar in bidest. sterilem Wasser suspendiert und die so gewonnene Suspension zum Impfen verwendet (z. B. DONALD et al. 1952). KOCH und DÉDIC (1957 a) gewinnen die Konidien mit einem speziell konstruierten Absauggerät von Vorkulturen in Petrischalen und stellen damit eine Suspension her. Die Konidien selbst enthalten Spurenelemente (FOSTER 1949). RENNERFELT (1934) konnte zeigen, daß mit steigender Mn-Konzentration des Sporulierungsmediums der Mn-Gehalt der Konidien von *A. niger* zunimmt. STEINBERG (1950) schlägt vor, den Testorganismus auf spurenen Medien vorzuzüchten. KOCH und DÉDIC (1957 b) haben unter Berücksichtigung einer Impfmenge von  $5 \cdot 10^8$  Konidien von *A. niger* die damit eingeschleppten Spurenelementmengen errechnet. Sie gelangten zur Ansicht, daß die Werte für die einzelnen Spurenelemente durchweg eine Zehnerpotenz unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze der Schimmelpilze liegen.

Nach den zitierten Angaben schien es angebracht, den Einfluß der Vorzüchtung des Impfmaterials auf die Nullwerte zu prüfen.

Mit *A. niger* als Testorganismus wurde nach der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Methode gereinigte Nährlösung A einerseits mit Konidien von Bierwürzeagar, andererseits mit Konidien von einem spurenen Nährboden geimpft.

Herstellung des spurenrarmen Nährbodens: 20 g gewaschener Agar wird zu 500 ml Wasser gegeben und mit 5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  30 Min. autoklaviert, heiß durch Watte und ein Whatman-Papierfilter filtriert und einem durch Extraktion gereinigten Medium (10 g Maltose, 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4$  pro 500 ml Wasser) zugesetzt. Der Nährboden wurde in gereinigte Reagenzgläser aus Jenaer G 20-Glas befüllt.

Das Wachstum auf diesem gereinigten Nährboden war nur schwach, verglichen mit demjenigen auf Bierwürzeagar. Die Konidien von *A. niger* zeigten nicht die tiefschwarze Pigmentierung wie auf Bierwürzeagar, sondern waren lediglich braunschwarz. Die Ergebnisse über den Einfluß des verschieden vorgezüchteten Impfmateri als auf die Nullwerte im Kulturversuch sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Tab. 10. Einfluß der Vorzüchtung des Impfmateri als auf die Nullwerte

- a) Konidien von gereinigtem synthetischen Nährboden  
b) Konidien von Bierwürzeagar

Variante		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
a	mg/25 ml	5,8	9,3	10,2	170,3	207,8	315,3
	$\bar{s}_x$	—	—	—	7,3	4,9	11,5
	% MTG	1,8	2,9	3,2	54	66	100
b	mg/25 ml	6,0	8,0	8,9	185,5	238,0	290,6
	$\bar{s}_x$	—	—	—	4,2	6,0	1,0
	% MTG	2,1	2,7	3,1	64	82	100

Nährlösung A,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -gereinigt. Kulturdauer 6 Tage, Durchschnitt aus drei Parallelen. Impfmenge: je  $10^6$  Konidien/25 ml Nährlösung. *A. niger*, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 10. Die relativen Nullwerte in der mit Konidien von gereinigtem Nährboden beimpften Serie sind für Cu um 10%, für Mn um 16% tiefer ausgefallen als die mit Konidien von Bierwürzeagar. Bei den Nullwerten für Zn und Fe ist kein Unterschied festzustellen. Die beiden Konidien suspensionen wurden je sechsmal mit bidestilliertem sterilem Wasser gewaschen. Es ist deshalb kaum anzunehmen, daß die Unterschiede der Cu- und Mn-Nullwerte auf Verunreinigungen im Suspensionswasser zurückzuführen sind, sondern die tieferen Cu- und Mn-Nullwerte dürften auf dem unterschiedlichen Gehalt der Konidien selbst beruhen.

Aus dem Vergleich der Myzeltrockengewichte im kompletten Medium der beiden Serien ersieht man, daß bei gleicher Impfmenge mit Konidien von gereinigtem Agar eine höhere Myzelausbeute erreicht wird als mit Konidien von Bierwürzeagar. Ein ähnlicher Effekt wurde von MEYRATH (1959) mit Myzel als Impfmateri als festgestellt. Ein auf spurenrarmer Nährlösung vorgezüchtetes Myzel ergab im nachherigen Kulturversuch eine höhere Myzelausbeute als auf spurenelementreicher Nährlösung vorgezüchtetes Impfmyzel.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß der Impfmenge auf die Nullwerte geprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11. Einfluß der Impfmenge auf die Nullwerte von Zn, Fe, Cu und Mn

Konidien pro 25 ml Nährlösung		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
10 <sup>5</sup>	mg/25 ml	6,0	5,0	8,4	136,8	207,1	297,4
	$\overline{s_x}$	—	—	—	15,5	3,7	25,5
	% MTG	2,0	1,7	2,8	46	70	100
10 <sup>6</sup>	mg/25 ml	6,6	5,6	10,0	173,4	292,0	382,0
	$\overline{s_x}$	—	—	—	11,2	8,3	8,3
	% MTG	1,7	1,5	2,6	45	76	100
10 <sup>7</sup>	mg/25 ml	7,3	7,8	13,4	193,3	310,0	374,2
	$\overline{s_x}$	—	—	—	4,0	3,8	7,2
	% MTG	2,0	2,1	3,6	52	83	100
10 <sup>8</sup>	mg/25 ml	8,5	13,3	14,5	219,0	348,7	376,0
	$\overline{s_x}$	—	—	—	12,7	0,4	10,6
	% MTG	2,3	3,5	3,8	58	92	100
2 · 10 <sup>8</sup>	mg/25 ml	9,3	13,5	28,0	254,0	356,3	391,4
	$\overline{s_x}$	—	—	—	17,1	2,7	2,5
	% MTG	2,4	3,4	7,2	65	91	100

Nährlösung A, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-gereinigt. Kulturdauer 6 Tage, Durchschnitt aus drei Parallelen. *A. niger*, M-Stamm.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 11. Die relativen Nullwerte der einzelnen Spurenelemente fallen mit steigender Impfmenge höher aus. So beträgt der relative Mn-Nullwert bei 10<sup>5</sup> Konidien pro Kolben 70% gegenüber 91% bei 2 · 10<sup>8</sup> Konidien. Beim Cu beträgt der Unterschied der relativen Nullwerte zwischen der höchsten und geringsten Impfmenge 19%. Selbst für Zn und Fe läßt sich mit steigender Impfmenge eine Erhöhung der Nullwerte feststellen.

Die Myzelausbeuten im kompletten Medium steigen ebenfalls mit zunehmender Impfmenge. Bei der Serie mit 10<sup>5</sup> Konidien pro Kolben fällt die große Streuung zwischen den Parallelen auf. Dies ist möglicherweise auf die mangelhafte Deckenbildung bei der geringsten angewendeten Impfmenge zurückzuführen.

Obwohl es an sich wünschenswert wäre, mit möglichst geringer Konidienzahl zu impfen, um tiefe Nullwerte zu erhalten, kann offenbar eine bestimmte Grenze nicht unterschritten werden, wenn noch ein hoher Myzelertrag im kompletten Medium erreicht und keine allzu große Streuung zwischen den Parallelkolben in Kauf genommen werden soll. Von diesem Gesichtspunkt aus ist eine Impfmenge von 10<sup>6</sup> Konidien pro Kolben gegenüber 10<sup>5</sup> unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen vorzuziehen.

## 7. Extraktionsmethode

Wie später gezeigt wird (siehe Kap. E), ist die Amylasebildung bei *A. oryzae* pH-abhängig. Die Versuche über den Einfluß von Spurenelementen auf die Enzymbildung müssen daher bei konstantem pH ausgeführt werden, und hierfür ist eine starke Pufferung der Nährlösung erforderlich. Phosphatpuffer erwiesen sich am geeignetsten. Bei Reinigung phosphatreicher Nähr-

lösungen mit der  $Al_2O_3$ -Methode werden nun aber die Phosphate ausgefällt. Es war deshalb zu prüfen, ob solche Nährlösungen (Nährlösung B) mit der Extraktionsmethode von Spurenelementen befreit werden können.

Die Extraktionsmethode beruht darauf, daß gewisse organische Verbindungen mit Metallionen innere Komplexsalze bilden können, welche in Wasser praktisch unlöslich, in organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln jedoch löslich sind. Hierfür werden vor allem die Reagenzien Diphenylthiocarbazon (Dithizon) und 8-Oxychinolin (Oxin), einzeln oder in Kombination, verwendet. In definierten pH-Bereichen können mit diesen Verbindungen alle Metallionen, welche erwiesenermaßen Spurenelementcharakter besitzen, erfaßt werden (KOCH und DÉDIC 1957 b).

Die praktische Durchführung geschah in Anlehnung an KOCH und DÉDIC (1957 b): 1 Liter des zu reinigenden Mediums wird auf das gewünschte pH eingestellt und in einem 2-Liter-Scheidetrichter aus Pyrex-Glas nach Zusatz von je 20 ml der Oxin- und Dithizonlösung während 1—2 Minuten kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die Extraktion bei gleichem pH mindestens noch zweimal wiederholt. Man überzeugt sich dann, ob das Chloroform beim Nachwaschen den reinen grünen Farbton der Dithizonlösung aufweist. Jede Abweichung vom Farbton der verdünnten Dithizonlösung deutet auf eine unvollständige Extraktion hin. Hierauf wird ein anderes erwünschtes pH eingestellt und wiederum so oft extrahiert, bis die Chloroformphase grün bleibt. Schließlich wird auf pH 6,0 eingestellt und der Überschuss an Oxin und Dithizon, sowie eventuell noch vorhandene Oxychinolate und Dithizonate durch dreimaliges Ausschütteln mit je ca. 25 ml Chloroform beseitigt. Um das in der Nährlösung enthaltene Chloroform entweichen zu lassen, wurde jeweils beim Autoklavieren mit dem Schließen des Autoklavventils etwas zugewartet.

#### Reagenzien:

Oxin p. a., 0,1% in  $CHCl_3$ .

Dithizon p. a., 0,05% in  $CHCl_3$ .

Chloroform: Zur Herstellung der Reagenzlösungen wurde die Qualität p. a. verwendet. Das Nachwaschen der extrahierten Nährlösungen erfolgte mit bidestilliertem Chloroform, welches durch Regenerierung der Abfälle gewonnen wurde (vgl. IWANTSCHJEFF 1958).

Ammoniak: konz. p. a. Ammoniak wird 1:1 mit bidest. Wasser verdünnt und zweimal am Vakuum destilliert (Hartglasapparatur). Das entwickelte  $NH_3$ -Gas wird in Waschflaschen aus Jenaer G 20-Glas eingeleitet, welche eisgekühltes bidestilliertes Wasser enthalten.

Salzsäure: p. a. HCl konz. wird 1:1 mit bidest. Wasser verdünnt und zweimal in einer Hartglasapparatur redestilliert.

Die günstigsten pH-Bereiche zur Komplexbildung der einzelnen Spurenelemente gehen aus den Angaben von SANDELL (1954) und IWANTSCHJEFF (1958) hervor. Mit Nährlösung B konnten für Fe und Mn optimale Reaktionswerte nicht eingestellt werden, da oberhalb pH 6,5 Ausfällungen einsetzten. Zur Entfernung von Zn und Cu ist es nicht notwendig, tiefer als pH 5 zu gehen. Dem für die Extraktion möglichen pH-Bereich waren also von vornherein recht enge Grenzen gesetzt.

In einem Versuch sollte abgeklärt werden, ob es von Vorteil ist, innerhalb des möglichen pH-Bereiches bei verschiedenem pH zu extrahieren, oder ob eine wiederholte Extraktion bei einem bestimmten pH ebenso wirksam ist.

Folgende Extraktionen wurden verglichen:

- a) Nährlösung B je 4 mal extrahiert bei pH 6,5, 5,0, 6,0,
- b) „ „ „ 5 mal extrahiert bei pH 6,5,
- c) „ „ „ 5 mal extrahiert bei pH 6,0,
- d) „ „ „ 5 mal extrahiert bei pH 5,5.

Die Nullwerte dieser Varianten sind in Tab. 12 zusammengestellt.

Tab. 12. Wirksamkeit der Extraktionsmethode bei verschiedenem pH

Variante		Nullwerte für					MTG
		O	Zn	Fe	Cu	Mn	
a	mg/25 ml	8,2	8,5	70,4	32,1	68,6	76,0
	$\bar{s}_x$	—	—	4,0	0,6	2,3	2,4
	% MTG	10,8	11,2	92	42	90	100
b	mg/25 ml	8,2	9,1	74,3	39,3	96,5	97,5
	$\bar{s}_x$	—	—	4,1	0,9	4,4	3,4
	% MTG	8,4	9,3	76	40	99	100
c	mg/25 ml	9,2	9,8	88,2	40,6	92,5	93,6
	$\bar{s}_x$	—	—	1,15	1,9	4,5	1,9
	% MTG	9,8	10	94	43	98	100
d	mg/25 ml	7,2	6,1	98,6	44,5	101,1	104,7
	$\bar{s}_x$	—	—	2,7	5,0	2,6	1,0
	% MTG	7	6	94	42	97	100

Kulturdauer 8 Tage, *A. oryzae*, Durchschnitt aus vier Parallelen, Nährlösung B.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 12. Die Extraktion bei einem bestimmten pH (Var. b, c, d) ist im allgemeinen ebenso wirksam wie Extraktionen bei verschiedenem pH (Var. a). Zn und Cu lassen sich bei allen Varianten gut extrahieren. Für das Fe ist die Extraktion bei pH 6,5 (Var. b) wirksamer als bei tieferen pH-Werten. Obwohl auch in Variante a bei pH 6,5 extrahiert wurde, beträgt der relative Nullwert für Fe hier 92%, gegenüber nur 76% in Variante b, was wohl auf die Einschleppung dieses Spurenelements mit  $NH_3$  und HCl zurückzuführen ist. Für das Mn ist die Extraktion in diesem pH-Bereich nicht wirksam.

In den folgenden Versuchen mit Nährlösung B wurde lediglich wiederholt bei pH 6,0 extrahiert. Durch sorgfältigere Phasentrennung, sowie durch Nachwaschen mit Chloroform nach jeder Extraktion ließen sich bei pH 6,0 auch die Fe-Nullwerte noch weiter senken.

### 8. Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Reinigungsmethoden

Verschiedene Autoren empfehlen, die Kohlenhydrate getrennt von den übrigen Bestandteilen einer Nährlösung mit Ionenaustauschern von Spurenelementen zu reinigen (NICHOLAS 1950, PERLMAN 1945, PERLMAN 1949, ROCHFORD und MANDLE 1953, McLEOD und SNELL 1950, TOMLINSON et al. 1951, WALKER 1953).

Zur Prüfung dieser Methode im Vergleich mit der Extraktions- und  $Al_2O_3$ -Methode wurden folgende Varianten angesetzt:

- a) Gesamte Nährlösung durch Extraktion mit Dithizon und Oxin bei pH 6,0 gereinigt.
- b) Anorganische Salze wie unter a) durch Extraktion gereinigt. Glucose als 4proz. Lösung über eine Säule von Dowex 50, H-Form, perkoliert. (Zur Überführung des Austauschermaterials in die H-Form wurde bidest. HCl benutzt. Die Säule wurde bis zur Chlorfreiheit mit bidest. Wasser gewaschen. Die ganze Apparatur war aus Pyrex-Glas.)

c) Glucoselösung (4%) und anorganische Salze werden getrennt mit je 5 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$ /500 ml autoklaviert (Glucoselösung bei pH 7,5, Lösung anorganischer Salze bei pH 6,8, um allzu große Phosphatausfällungen zu vermeiden).

Die Nullwerte für *A. niger* und *A. oryzae* sind in Tab. 13 zusammengestellt.

Tab. 13. Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Reinigungsmethoden

a) Extraktion, b) Ionenaustauscher/Extraktion, c)  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Test-organismus	Variante		Nullwerte für					MTG
			O	Zn	Fe	Cu	Mn	
<i>A. niger</i>	a	mg/25 ml	5,0	5,3	135,3	91,2	120,3	156,0
		$\overline{s_x}$	—	—	4,8	5,3	2,4	4,8
		% MTG	3,2	3,4	86	58	77	100
	b	mg/25 ml	7,9	7,3	175,7	116,9	161,9	171,5
		$\overline{s_x}$	—	—	3,7	16,0	1,0	0,5
		% MTG	4,6	4,3	102	68	94	100
c	mg/25 ml	4,5	5,8	52,6	92,5	98	114	
	$\overline{s_x}$	—	—	5,5	10,0	6,7	1,1	
	% MTG	4,0	5,1	46	81	86	100	
<i>A. oryzae</i>	a	mg/25 ml	12,8	8,3	47,3	56,8	99,5	87,3
		$\overline{s_x}$	—	—	4,0	1,7	1,5	1,5
		% MTG	14,7	9,5	54,2	65,0	114	100
	b	mg/25 ml	10,5	9,8	120,2	78,2	145,5	123,3
		$\overline{s_x}$	—	—	2,1	3,2	1,0	0,8
		% MTG	8,5	8,0	97,5	63,4	118,0	100
c	mg/25 ml	7,9	8,6	13,1	86,5	103,6	108,9	
	$\overline{s_x}$	—	—	—	0,7	0,4	1,9	
	% MTG	7,3	7,9	12,0	79	95	100	

Medium: 20 g Glucose, 10 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 10 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  pro Liter. Kulturdauer 7 Tage. Durchschnitt aus drei Parallelen.

#### Besprechung der Ergebnisse von Tab. 13

1. Das Zink ist, praktisch ohne Unterschiede, mit allen Varianten leicht zu beseitigen.
2. Das Eisen wird unterschiedlich entfernt; am wirkungsvollsten ist die  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Adsorption mit relativen Nullwerten von 46% für *A. niger* und 12% für *A. oryzae*. An zweiter Stelle folgt Dithizon-Oxin-Extraktion mit relativen Fe-Nullwerten von 86% für *A. niger* und 45% für *A. oryzae*. Die Kombination Ionenaustauscher/Extraktion ergibt keinen guten Reinigungseffekt, denn es wird 100 proz. Wachstum erreicht. Als einzige Wirkung war spärlichere Konidienbildung zu beobachten.
3. Die Cu-Nullwerte fallen bei der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Methode höher aus als in den beiden anderen Varianten. Extraktion und Ionenaustauscher/Extraktion sind in ihrer Wirksamkeit zur Entfernung von Cu einander ebenbürtige Methoden.
4. Gemessen am Bedarf von *A. niger* wird das Mn am besten durch Extraktion entfernt (77%), gefolgt von  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Adsorption (86%) und



Kombination Ionenaustauscher/Extraktion (94%). Bei *A. oryzae* läßt sich das Mn durch keine der drei Varianten so weit entfernen, daß ein Mangel sichtbar wird.

Aus dem Vergleich der Nullwerte für die beiden Organismen bei jeweils gleicher Reinigungsmethode lassen sich Unterschiede im Bedarf für einzelne Spurenelemente feststellen:

1. *A. niger* benötigt mehr Zink als *A. oryzae*. Die relativen Zn-Nullwerte betragen durchschnittlich 4% für *A. niger*, für *A. oryzae* hingegen 8%.
2. Der Bedarf an Eisen ist für *A. oryzae* größer als für *A. niger*, denn der relative Fe-Nullwert beträgt z. B. in Variante c nur 12% für *A. oryzae*, für *A. niger* dagegen 46%.
3. Betreffend Cu-Bedarf lassen sich keine Unterschiede feststellen.
4. *A. niger* benötigt mehr Mn als *A. oryzae*.

Bei der Reinigung der C-Quelle mit Dowex 50 (Var. b) fällt vor allem der hohe Fe-Nullwert auf. Dieses Ergebnis stimmt mit Angaben von PERLMAN (1945) überein, wonach es schwierig sein soll, Lösungen durch Perkolations über einen Kationenaustauscher in der H-Form von Fe-Ionen zu befreien. Er schlägt deshalb vor, zur besseren Entfernung von Fe den Austauscher erst in der Mg-Form und anschließend in der Na-Form zu benutzen.

#### D. Enzymatische Aktivitätsmessungen

##### 1. Bestimmung der dextrinogenen Aktivität

Es wurde zur Aktivitätsbestimmung die modifizierte Wohlgemuth-Methode nach MEYRATH (1957 a) benutzt.

In ein dickwandiges Reagenzglas werden 20 ml 1 proz. Stärkelösung gegeben und in einem Wasserbad auf die gewünschte Temperatur gebracht (20° C). 10 ml einer ebenfalls auf 20° C temperierten Enzymlösung werden hinzupipettiert und gut mit der Stärkelösung vermischt. In bestimmten Zeitabständen, welche sich nach der Aktivität der Enzymlösung richten, wird 1 ml der Reaktionsmischung zu 5 ml einer verdünnten Jodlösung pipettiert und die sich entwickelnde Färbung mit einem Farbstandard verglichen. Die Reaktion wird so lange verfolgt, bis die Jod-Stärkefärbung dem gewählten Farbstandard entspricht. Die hierfür benötigte Zeit wird als Dextrinisierungszeit (t) bezeichnet.

##### Reagenzien:

Vorratsjodlösung: 11 g Jod und 22 g Kaliumjodid werden in 500 ml Wasser gelöst.

Verdünnte Jodlösung: 2 ml der Vorratsjodlösung werden mit 20 g Kaliumjodid in 500 ml Wasser gelöst.

Farbstandard: 20 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  und 3 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  werden mit 10 ml 0,1 n HCl zu 100 ml Wasser gelöst.

Stärkelösung: 10 g lösliche Analarstärke werden in wenig Wasser zu einem Brei angerührt und quantitativ zu ca. 750 ml siedendem Wasser gegeben. Nach 10 minütigem Kochen wird sofort abgekühlt, mit 150 ml 2 n NaOH versetzt, das pH mit 2 m Zitronensäure auf 5,0 eingestellt und die Lösung mit dest. Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

In Abänderung der Vorschriften von MEYRATH wurde das pH der Stärkelösung auf 5,0 eingestellt, nachdem sich gezeigt hatte, daß bei diesem pH eine optimale Dextrinisierungszeit erreicht wird. Um ein pH von 5,0 im Reaktionsgemisch zu erreichen, mußte die Stärkelösung stärker gepuffert werden.

Die Angabe der dextrinogenen Aktivität erfolgt in Einheiten nach MEYRATH durch die Umrechnung:  $cd = 1/t \times 1000$ , wobei t die Dextrinisierungszeit in Minuten bedeutet. Sie gibt unmittelbar ein Bild von der Enzym-

konzentration im untersuchten Substrat, da MEYRATH nachgewiesen hat, daß zwischen dem reziproken Wert der Dextrinisierungszeit und der Enzymkonzentration Linearität herrscht. Als spezifische dextrinogene Aktivität gilt in der Folge der Quotient:

$$\frac{cd}{MTG}$$

wobei MTG das Myzeltrockengewicht pro 25 ml Nährlösung bedeutet. Mit der beschriebenen Art der Aktivitätsbestimmung wird hauptsächlich die

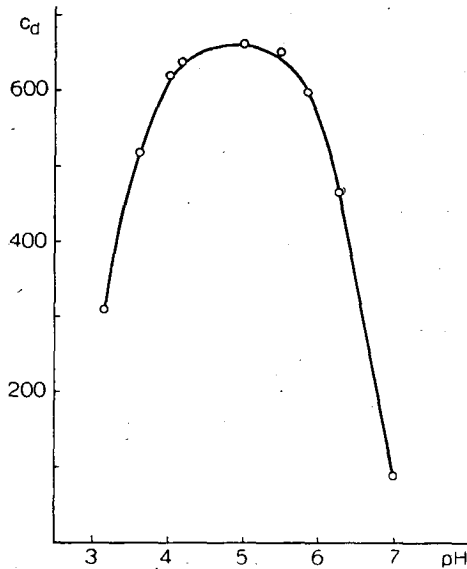


Abb. 1. Abhängigkeit der dextrinogenen Aktivität eines Kulturfiltrates von *A. oryzae* vom pH des Reaktionsgemisches (Enzymlösung + Stärkelösung)

$\alpha$ -Amylase erfaßt, welche an beliebigen Stellen des Stärkemoleküls die  $\alpha$ -1,4-Bindungen spaltet unter Bildung niedermolekularer Dextrine.

a) Bestimmung der extrazellulären dextrinogenen Aktivität

Das vom Myzel befreite Kulturfiltrat stellt die Enzymlösung dar.

b) Bestimmung der intrazellulären dextrinogenen Aktivität

Das Myzel wird wie üblich mit einem Gazetuch über eine Porzellannutsche vom Substrat abfiltriert, mit 5—6 Güssen dest. Wasser gewaschen und jedesmal gründlich ausgepreßt.

Das feuchte Myzel wird hierauf vorerst grob in einem Mörser zerrieben und anschließend in einem Potter-Elvehjemkolben mit Eiskühlung bis zur Zellfreiheit aufgeschlossen (mikroskopische Kontrolle). Die Myzelrümpfer werden in 25 ml dest. Wasser aufgeschwemmt und, nach 24 stündiger Aufbewahrung bei 0° C, zentrifugiert. 10 ml des überstehenden Eluats werden als Enzymlösung zur Bestimmung der intrazellulären Aktivität verwendet. Durch Aufbewahren der Myzelrümpfer unter Toluolzusatz (HUGO 1954) wurde keine höhere Ausbeute an intrazellulärer Amylase erzielt. Selbst wenn die zentrifugierten und gewaschenen Myzelrümpfer nochmals mit dem Potter-Elvehjemkolben zerrieben und neuerdings mit dest. Wasser eluiert wurden, konnte keine Rest-

aktivität mehr ermittelt werden. Man kann also annehmen, daß mit der beschriebenen Methode die intrazelluläre dextrinogene Amylase quantitativ erfaßt wird.

## 2. Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Die Aktivitätsmessung proteolytischer Enzyme kann auf sehr unterschiedliche Weise durchgeführt werden (Übersicht: BAMANN und MYRBÄCK 1941, COLOWICK und KAPLAN 1957).

Es seien einige Methoden aufgezählt, die schon zur Bestimmung von Proteasen der *A. flavus-oryzae*-Gruppe verwendet wurden:

Viskosimetrische Verfolgung des Gelatineabbaues (MAXWELL 1950, 1952, DWORSCHACK et al. 1952, KIUCHI 1954). Acidimetrische Bestimmung der bei der Hydrolyse von Gelatine oder Casein freigesetzten Carboxylgruppen (PECHMANN 1951, DWORSCHACK et al. 1952). Nephelometrische Bestimmung des nichtabgebauten Caseins (DWORSCHACK et al. 1952). Bestimmung des beim Caseinabbau in Trichloressigsäure löslich gewordenen Stickstoffs (PECHMANN 1951). Kolorimetrische Bestimmung der beim Caseinabbau in Trichloressigsäure löslich gewordenen aromatischen Aminosäuren mit dem Phenolreagens nach FOLIN und CIOCALTEAU (ANSON 1938, PECHMANN 1951, NAKANISHI 1959).

Die zuletzt erwähnte Bestimmungsmethode wurde für die eigenen Untersuchungen gewählt, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß gut reproduzierbare Meßergebnisse erzielt werden können.

Reagenzien: 1 g Casein nach Hammersten (Merck) werden in 100 ml m/15 Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (pH 6,7) suspendiert und 20 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird auf 100 ml ergänzt.

Phenolreagens: In einem 1500-ml-Kolben werden 100 g  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  gelöst in 700 ml Wasser, mit einem Gemisch von 50 ml 85 proz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und 100 ml konzentrierter HCl versetzt und während 10 Std. am Rückfluß gekocht. Hierauf werden 150 g  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 50 ml Wasser und ein paar Tropfen flüssiges Brom hinzugegeben und nochmals ohne Rückflußkühler 15 Min. gekocht, um das überschüssige Brom entweichen zu lassen. Nach dem Abkühlen wird auf 1 Liter verdünnt und filtriert. Das Reagens soll keinen grünen Farbton aufweisen und muß in gut verschlossener dunkler Flasche aufbewahrt werden.

### Durchführung der Aktivitätsmessung:

5 ml 1 proz. Caseinlösung werden im Wasserbad bei 20° C mit 2 ml der Enzymlösung versetzt und gut gemischt. Die Reaktion wird nach 1—2 Std. durch Zugabe von 10 ml 5 proz. Trichloressigsäure unterbrochen. Nach kräftigem Schütteln wird das Gemisch über ein Faltenfilter filtriert.

In einen 50-ml-Erlenmeyerkolben gibt man dann 5 ml des Filtrats, 10 ml 0,5 n NaOH und unter Schütteln 3 ml des 1:3 mit Wasser verdünnten Phenolreagens. Die sich bildende blaue Farbe wird nach 10 Min. gegen eine Vergleichslösung bei 660  $\mu$  kolorimetriert.

Vergleichslösung: Zu 5 ml Caseinlösung werden 10 ml Trichloressigsäure und anschließend 2 ml Enzymlösung beigefügt, das Gemisch gut geschüttelt und filtriert.

Nach J. R. SPIES (zit. in COLOWICK und KAPLAN 1957) ergibt sich bei der kolorimetrischen Bestimmung von reinen Tyrosin- und Tryptophanlösungen eine lineare Beziehung zwischen molarer Konzentration der Aminosäuren und Extinktionswert ( $\log I_0/I$ ).

Die proteolytische Aktivität des Pepsins wird von ANSON (1938) in Tyrosinäquivalenten ausgedrückt. NAKANISHI (1959) gibt die Aktivität der Proteasen von *A. oryzae* in Extinktionswerten an.

In der vorliegenden Arbeit gilt als Aktivitätsmaß der Extinktionswert  $\log I_0/I$ , der sich bei der Bestimmung des Trichloressigsäurefiltrats mit dem Folin-Ciocalteau-Reagens ergibt.

Die Beziehung zwischen Extinktionswert und Konzentration des Trichloressigsäurefiltrates aus zwei Fermentansätzen mit Kulturfiltraten von *A. oryzae* als Enzymlösungen zeigt Abb. 2. Der Konzentration 5 entspricht

das unverdünnte Trichloressigsäurefiltrat aus dem Fermentansatz (5 ml). Die Konzentrationen 4, 3, 2, 1 stellen entsprechende Verdünnungen des gleichen Filtrates dar.

Aus Abb. 2 geht hervor, daß zwischen der Konzentration der nach dem enzymatischen Caseinabbau mit Trichloressigsäure nicht mehr fällbaren Spaltprodukte (Aminosäuren und Peptide) und dem Extinktionswert Linearität besteht, sofern ein Extinktionswert von 1,0 nicht überschritten wird.

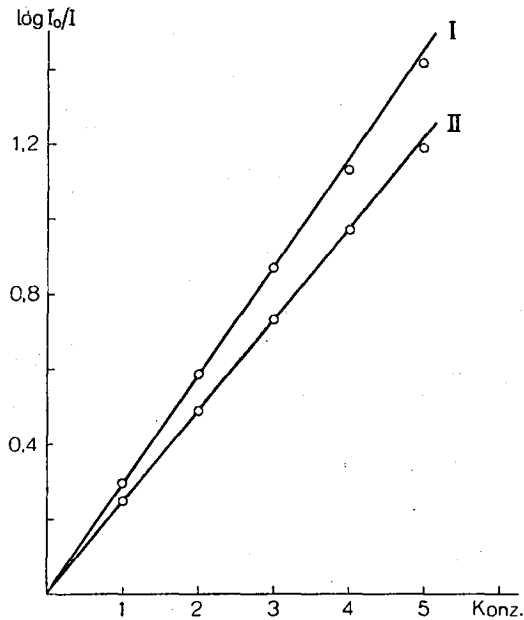


Abb. 2. Abhängigkeit der Extinktion  $\log I_0/I$  von der Konzentration der beim enzymatischen Caseinabbau mit Enzymlösungen von *A. oryzae* erhaltenen Trichloressigsäurefiltrate

Es sei noch erwähnt, daß  $1,6 \cdot 10^{-3}$  mäß. Tyrosin einem Extinktionswert von 0,7 entsprechen (eigene Bestimmung).

Abb. 3 zeigt die Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Extinktion. Zur Aufnahme dieser Eichkurve wurde ein Kulturfiltrat von *A. oryzae* auf Pepton als N-Quelle verwendet. Die Einwirkungszeit des Fermentansatzes betrug 2 Std. Zwischen Enzymkonzentration und Extinktion besteht also Linearität, sofern ein Extinktionswert von 0,7—0,8 nicht überschritten wird. Bei den Aktivitätsmessungen von *A. oryzae*-Kulturfiltraten (Nährlösung B) wurde der genannte Extinktionswert in 2 stündiger Fermenteinwirkung nur mit wenigen Ausnahmen überschritten. Die Extinktionswerte stellen demnach ein direktes Maß der Enzymkonzentration dar. Für höhere Extinktionswerte kann die entsprechende Enzymkonzentration aus Abb. 3 ermittelt werden.

Tab. 14 gibt Extinktionsmessungen bei verschiedenem pH im Reaktionsgemisch wieder und zeigt, daß die proteolytische Aktivität eines Kulturfiltrates von *A. oryzae* innerhalb eines pH-Bereiches von 5,7—7,7 praktisch

konstant ist. Außerhalb des aufgeführten pH-Bereiches wurden keine Aktivitätsmessungen ausgeführt, da die Caseinlösung Tendenz zur Ausflockung zeigte.

Daß die proteolytische Aktivität keine pH-Abhängigkeit erkennen läßt, deutet auf das Vorhandensein mehrerer Proteasen hin. Nach Angaben der

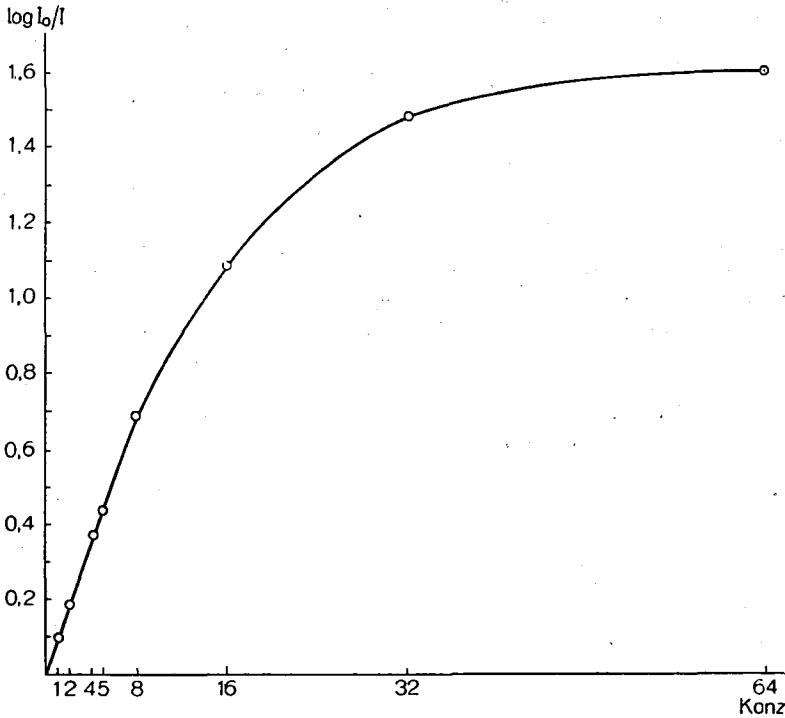


Abb. 3. Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration einer Enzymlösung von *A. oryzae* nach 2 stündiger Reaktionszeit

Tab. 14. Einfluß des pH auf die proteolytische Aktivität ( $\log I_0/I$ ) eines Kulturfiltrates von *A. oryzae*

Einwirkungszeit	pH im Reaktionsgemisch				
	5,7	6,5	6,7	7,2	7,7
30 Min.	0,18	0,19	0,18	0,17	0,17
60 Min.	0,36	0,40	0,37	0,36	0,36

Literatur ist dies in Kulturfiltraten von *A. oryzae* auch zu erwarten. MAXWELL (1952) stellte auf einem modifizierten Raulinnährboden ein Gemisch von drei Proteasen fest mit Aktivitätsoptima bei pH 4,5, 6,0–7,0 und 8,5. GILLESPIE et al. (1952) konnten in einem Kulturfiltrat von *A. oryzae* vier verschiedene Fraktionen mit proteolytischer Aktivität durch Papierchromatographie trennen.

## E. Einfluß von pH und N-Quelle auf die Bildung dextrinogener Amylase

### 1. Literatur

Nach MIHASHI und TATSUMI (1954) produziert *A. oryzae* mehr Amylase auf  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oder Tyrosin als auf  $\text{NaNO}_3$ . STÁRKA (1955) hingegen erreichte höhere Amylaseausbeuten mit  $\text{NaNO}_3$  als mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Aus den Untersuchungen von FENIKSOVA (1957) und SMIRNOV (1958) geht hervor, daß primär die durch Verwendung verschiedener N-Quellen hervorgerufenen pH-Änderungen die Amylaseausbeute beeinflussen. FENIKSOVA (1957) stellte fest, daß auch das Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärer Amylaseausbeute vom pH der Nährlösung abhängig ist. So betrug in ihren Versuchen die extrazelluläre amylytische Aktivität nur 23% der Gesamtaktivität (Kulturfiltrat + Myzel), wenn das pH einer Czapek-Nährlösung mit  $\text{NaNO}_3$  während der Inkubation von 6,7 auf 7,2 anstieg. In der gleichen mit m/15 Phosphat auf pH 6,2 gepufferten Nährlösung betrug die extrazelluläre amylytische Aktivität 85% bei verdoppelter Gesamtaktivität.

Aus obigem ergibt sich, daß bei Untersuchungen über den Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung amylytischer Enzyme das pH der Nährlösung im Verlauf der Kulturdauer konstant gehalten werden muß.

Die eigenen Untersuchungen umfassen: Den Einfluß des pH der Nährlösung auf Bildung und Stabilität extrazellulärer amylytischer Enzyme, sowie den Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung extrazellulärer amylytischer Enzyme bei konstantem pH.

### 2. Einfluß des pH der Nährlösung auf die Bildung extrazellulärer dextrinogener Amylase

Nährlösung: 20 g Dextrin, 18 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 22 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  oder 1 Liter mit Leitungswasser. pH mit 6 n HCl bzw. 30% NaOH eingestellt.

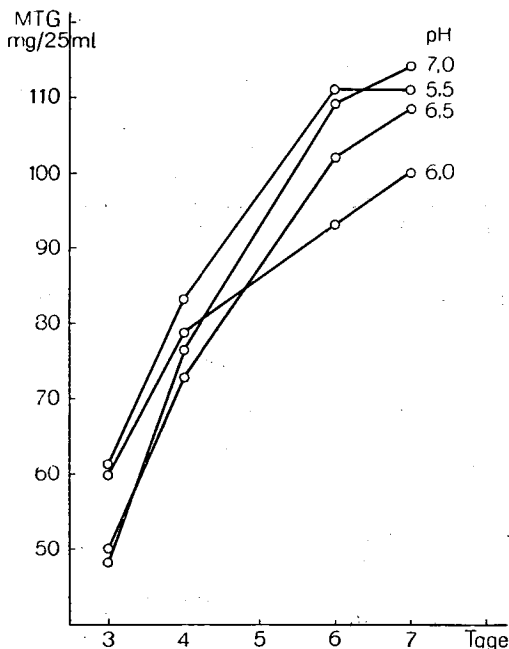


Abb. 4 a. Einfluß des pH der Nährlösung auf die Bildung dextrinogener Amylase

Abb. 4 a zeigt, daß die Bildung extrazellulärer Amylase im Bereich von pH 5,5—7,0 mit steigendem pH abnimmt. Die Aktivitätsabnahme von pH 5,5 auf 7,0 beträgt rund 50%, während der Myzelertrag in diesem pH-Bereich praktisch unverändert bleibt (Abb. 4 b).

Ein weiterer Versuch ergab, daß bei pH 7,5 und 8,0 keine weitere Abnahme an extrazellulärer dextrinogener Amylase eintritt, sondern daß im

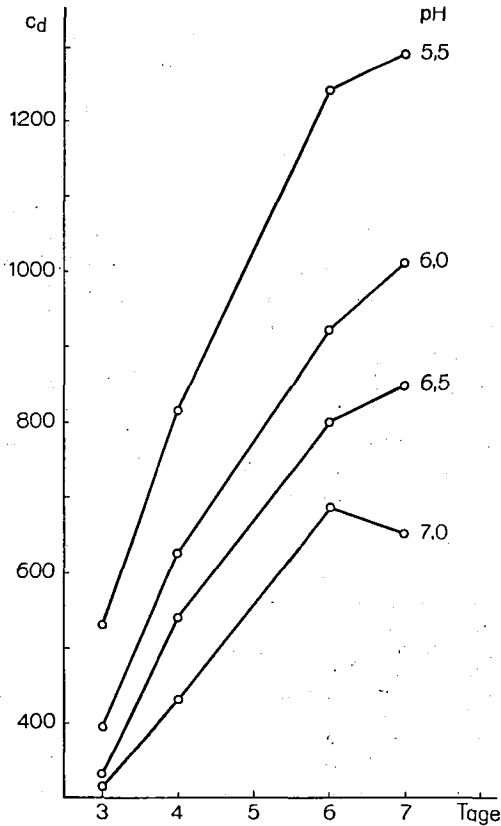


Abb. 4 b. Einfluß des pH der Nährlösung auf die Myzelbildung

Gegenteil eine leichte Zunahme gegenüber pH 7,0 zu beobachten war. Bei einem pH der Nährlösung von 5,0 betrug die nachweisbare Amylase nur noch 25% derjenigen bei pH 5,5. In einer weiteren Variante mit eingestelltem pH 4,0 konnte im Kulturfiltrat praktisch keine Aktivität mehr festgestellt werden.

### 3. Einfluß des pH auf die Stabilität dextrinogener Amylase

Auf Grund obiger Ergebnisse wurde der Einfluß des pH auf die Stabilität der dextrinogenen Amylase untersucht.

Ein Kulturfiltrat bekannter Aktivität wurde mit NaOH oder HCl auf das gewünschte pH eingestellt und davon je eine Serie bei 0° C und 25° C aufbewahrt.

Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die Aktivität gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Tab. 15. Aktivitätsabnahme einer AmylaseLösung (Kulturfiltrat) in Funktion von Zeit, Temperatur und pH (Restaktivität in % der Ausgangsaktivität)

Temperatur	pH	Zeit in Tagen		
		1	3	7
0° C	4,5—9,0	100	100	100
	4,0	84	66	60
25° C	5,5—9,0	100	100	—
	5,0	86	68	—
	4,5	67	48	—
	4,0	9	0	—

Tab. 15 zeigt, daß die Amylase bei 25° C (Bebrütungstemperatur) unterhalb pH 5,5 inaktiviert wird. Nach 24 Std. beträgt die Aktivitätsabnahme bei pH 5,0 14%, nach 3 Tagen 32%. Nach 3 Tagen beträgt der Aktivitätsverlust bei pH 4,5 52%, bei pH 4,0 100%. Die gebildete Amylase bleibt bei 25° C im pH-Bereich 5,5—9,0 stabil.

Bei 0° C bleibt die Amylase noch bei tieferem pH stabil als bei 25° C. Im pH-Bereich 4,5—9,0 läßt sich während 7 Tagen kein Aktivitätsverlust feststellen. Bei pH 4,0 beträgt die Aktivitätsabnahme nach 7 Tagen 40%.

Die Ergebnisse über den Einfluß des pH auf die Stabilität der Amylase in Kulturfiltraten von *A. oryzae* zeigen, daß in Kulturversuchen ein pH von 5,5 nicht unterschritten werden darf.

#### 4. Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung extrazellulärer dextrinogener Amylase

In den folgenden Versuchen wurde die Nährlösung mit  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  so stark gepuffert, daß das pH im Verlauf der Kulturdauer konstant blieb. Es hatte sich zwar gezeigt, daß mit pH 5,5 der Nährlösung die höchsten Amylaseausbeuten erreicht werden; da jedoch bei pH 5,5 zur pH-Konstanthaltung beträchtlich höhere Mengen an Phosphatsalzen notwendig sind als bei pH 6,0 (bei pH 6,0 ist die Pufferwirkung der Phosphatsalze besser), wurde ein Kultivierungs-pH von 6,0 gewählt, und die Nährlösungen wurden jeweils mit 6 n HCl auf diesen Wert eingestellt.

In einem ersten Versuch wurden  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 zusammengestellt.

Tab. 16. Einfluß verschiedener Ammonsalze auf Wachstum und Bildung extrazellulärer Amylase

Kulturdauer (Tage)	N-Quelle					
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		$\text{NH}_4\text{NO}_3$	
	MTG	cd	MTG	cd	MTG	cd
2	10,2	—	9,0	—	11,5	—
3	51,7	545	50,8	430	54,1	364
4	66,1	924	68,2	924	69,0	752
5	68,4	1000	70,7	1000	69,0	800
6	70,3	1090	74,4	1090	65,6	856
7	63,1	1090	67,0	1090	67,6	924
9	59,7	1090	67,9	1090	69,5	924

Nährlösung B, Durchschnitt aus zwei Parallelen, N-Gehalt überall entsprechend 1,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter.



Aus Tab. 16 geht hervor, daß mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  die extrazelluläre Amylaseausbeute um 15% niedriger ausfällt als mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Die beiden letzteren N-Quellen ergeben unter sich gleiche Amylaseausbeute.

In Tab. 17 sind die Amylaseausbeuten mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ , Pepton und Glutaminsäure dargestellt.

Tab. 17. Einfluß einiger N-Quellen auf Wachstum und Bildung extrazellulärer dextrinogener Amylase

N-Quelle	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{NH}_2\text{CONH}_2$	Pepton	Glutaminsäure
MTG in mg pro 25 ml				
Medium . . . . .	163,2	188,6	161,0	220,0
cd . . . . .	600	312	105	330
cd/MTG . . . . .	3,7	1,65	0,65	1,5

Durchschnittswerte aus zwei Parallelen. Nährlösung: 20 g Glucose, 40 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , pH = 6,0. N-Gehalt überall entsprechend 2,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{Liter}$ .

Tab. 17 zeigt, daß hier mit Ammonnitrat die höchste Amylaseausbeute erreicht wird. Mit Harnstoff und Glutaminsäure beträgt die Amylaseausbeute nur 50%, mit Pepton sogar nur 18% derjenigen von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

In einem weiteren Versuch mit verschiedenen Nährlösungen zeigte sich, daß durch Erhöhung der Peptonkonzentration die Amylaseausbeute gesteigert werden kann und sogar diejenige von Ammonphosphat übertrifft (Tab. 18).

Die folgenden Medien wurden miteinander verglichen:

- a) Maltose . . . . . 16 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  . . . . . 20 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  . . . . . 20 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  . . . . . 1,6 g
- $\text{MgSO}_4$  . . . . . 0,4 g
- ad 1 Liter mit dest. Wasser
- b) wie a), aber 0,5 g Pepton
- statt  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- c) Maltose . . . . . 8 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  . . . . . 20 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  . . . . . 20 g
- Pepton . . . . . 10 g
- $\text{MgSO}_4$  . . . . . 0,4 g
- ad 1 Liter mit dest. Wasser
- d) wie c), aber 10 g Casein: Hammarsten
- an Stelle von Pepton

Das pH wurde überall mit 5 n HCl auf 6,0 eingestellt.

Allen Varianten wurden 400  $\gamma$  Zn, 400  $\gamma$  Fe, 40  $\gamma$  Cu und 20  $\gamma$  Mn zugesetzt.

Tab. 18. Einfluß verschiedener Nährlösungen auf Wachstum und Bildung dextrinogener Amylase

Medium	Kulturdauer (Tage)					
	4 MTG	5 MTG	6 MTG	cd	10 MTG	cd
a	82,4	110,9	124,2	706	109,0	750
b	70,4	88,5	94,1	250	106,5	316
c	61,8	81,4	90,4	1330	78,4	1330
d	42,1	80,1	95,9	800	118,0	1000

Durchschnitt aus zwei Parallelen.

Besprechung der Ergebnisse von Tab. 18. Die Amylaseausbeute ist bei gleicher N-Konzentration mit Pepton (b) geringer als mit  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (a). Wird die Maltosegabe reduziert und durch annähernd die gleiche Menge Pepton ersetzt (c), so ergibt sich eine um 80% erhöhte Amylaseausbeute gegenüber Medium a. Wird Maltose in gleicher Weise durch Casein ersetzt (d), so fällt die Amylaseausbeute, verglichen mit (c) niedriger aus, ist aber immer noch höher als in Medium (a).

Die Untersuchungen waren deshalb von Interesse, weil mit Pepton als N-Quelle geringere pH-Änderungen in der Nährlösung auftreten als mit  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  und demzufolge weniger Phosphatsalze zugesetzt werden müssen, um pH-Konstanz zu gewährleisten. Wie bereits erwähnt, ist eine möglichst geringe Pufferung im Hinblick auf die Reinigung von Nährlösungen nach der Extraktionsmethode wünschenswert, damit ohne allzu große HCl- oder  $\text{NH}_3$ -Zusätze bei verschiedenem pH extrahiert werden kann. Durch die hohen Peptongaben wird jedoch die Viskosität der Nährlösung erhöht, was zu starker Schaumbildung beim Schütteln führt, so daß eine gute Phasentrennung auch bei längerem Stehenlassen nicht erreicht und eine wirkungsvolle Extraktion unmöglich wird.

Na-Zitrat, welches in dem für die Amylasebildung erwünschten pH-Bereich eine größere Pufferkapazität aufweist als Phosphate gleicher molarer Konzentration, erwies sich deshalb als ungeeignet, weil es bei der Extraktion einen geringeren Reinigungseffekt ergibt. Offenbar hat Zitrat ein größeres Komplexbildungsvermögen für Spurenelemente als Phosphat. Zudem kann Zitrat als C-Quelle dienen, so daß nach Abbau der Haupt-C-Quelle ein zusätzliches Wachstum, verbunden mit starkem pH-Anstieg, eintritt.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde für die Untersuchungen über Spurenelementeinfüsse auf die Amylasebildung  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  als N-Quelle und Phosphat zur Pufferung verwendet (vgl. Nährlösung B).

### III. Einfluß von Spurenelementen auf Wachstum und Enzymbildung von *Aspergillus oryzae*

#### I. Übersicht

Die Untersuchungen umfassen die Elemente Zn, Fe, Cu, Mn und Mg. Der Einfluß einzelner Spurenelemente in steigender Konzentration wird zunächst bei optimaler Konzentration aller übrigen Elemente mit gereinigter Nährlösung B untersucht.

In einem 1. Versuch wurden jeweils Wachstum und Bildung extrazellulärer Amylase während 7 Tagen verfolgt. In einem 2. Versuch sollte geprüft werden, ob sich die im 1. Versuch festgestellten Effekte reproduzieren lassen. Zudem wurde die intrazelluläre Aktivität ermittelt, um abzuklären, ob sich die Spurenelementeinfüsse auf die gesamte Amylaseausbeute auswirken, oder ob lediglich eine Verschiebung zwischen intra- und extrazellulärem Amylasegehalt eintritt. Ferner wurde die proteolytische Aktivität im 6- und 8-tägigen Kulturfiltrat bestimmt. Schließlich wurde der Einfluß einiger Spurenelementmangel-Kombinationen auf Wachstum und Bildung extrazellulärer amylyolytischer und proteolytischer Enzyme untersucht.

2. Einfluß von Zink

a) Ergebnisse des 1. Versuches

Tab. 19. Einfluß steigender Zn-Gaben auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus vier Parallelen

Zn/Liter	Kulturdauer in Tagen				
	3	4	5	6	7
0	5,2	6,7	7,2	7,1	10,0
4 $\gamma$	7,2	6,7	8,8	7,8	12,2
10 $\gamma$	6,2	7,4	18,5	14,6	29,5
20 $\gamma$	9,7	14,8	18,1	21,2 $\pm$ 1,3	29,3 $\pm$ 2,1
40 $\gamma$	12,8	30,0	37,6 $\pm$ 1,7	47,5 $\pm$ 4,4	50,1 $\pm$ 3,9
100 $\gamma$	28,1	78,3 $\pm$ 10,5	125,4 $\pm$ 9,5	120,5 $\pm$ 9,1	123,4 $\pm$ 3,7
200 $\gamma$	31,7	105,3 $\pm$ 1,2	132,0 $\pm$ 2,9	151,3 $\pm$ 4,4	133,2 $\pm$ 2,5
1 mg	35,0	98,4 $\pm$ 8,4	134,0 $\pm$ 9,5	122,2 $\pm$ 3,7	121,9 $\pm$ 0,8
10 mg	36,6	71,9 $\pm$ 5,2	108,9 $\pm$ 5,6	149,8 $\pm$ 5,8	131,6 $\pm$ 1,5
100 mg	23,5	69,0 $\pm$ 6,1	104,8 $\pm$ 8,5	125,1 $\pm$ 5,7	115,2 $\pm$ 3,9

Tab. 20. Einfluß steigender Zn-Gaben auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Zn/Liter	Kulturdauer in Tagen							
	4		5		6		7	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	55	8,3	48	6,7	67	9,4	100	10,0
4 $\gamma$	57	8,5	55	6,2	74	9,5	125	10,2
10 $\gamma$	64	8,7	182	9,8	—	—	273	9,2
20 $\gamma$	105	7,5	167	9,2	182	8,7	250	8,5
40 $\gamma$	167	5,6	235	6,2	333	6,3	364	7,2
100 $\gamma$	600	7,7	750	6,0	856	7,1	1000	8,0
200 $\gamma$	666	6,3	800	6,1	856	5,7	1000	7,5
1 mg	570	5,7	666	5,0	750	6,2	800	6,6
10 mg	522	7,3	666	6,1	750	5,0	800	6,1
100 mg	480	7,0	600	5,7	707	5,6	750	6,5

b) Ergebnisse des 2. Versuches

Tab. 21. Einfluß steigender Zn-Gaben auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus zwei Parallelen

Zn/Liter	Kulturdauer in Tagen				
	3	4	6	8	10
0	—	—	—	—	10,9
20 $\gamma$	10,0	25,5 $\pm$ 3,7	48,4 $\pm$ 1,4	53,4 $\pm$ 5,4	68,3 $\pm$ 4,7
40 $\gamma$	25,4	50,6 $\pm$ 12,2	78,6 $\pm$ 4,4	92,7 $\pm$ 1,1	103,2 $\pm$ 3,2
60 $\gamma$	26,7	79,8 $\pm$ 1,4	98,1 $\pm$ 2,7	109,7 $\pm$ 2,7	107,3 $\pm$ 0,5
200 $\gamma$	42,4	101,0 $\pm$ 0,8	117,2 $\pm$ 7,2	117,1 $\pm$ 4,3	108,4 $\pm$ 0,6
10 mg	20,0	87,1 $\pm$ 1,7	129,3 $\pm$ 0,9	120,8 $\pm$ 2,4	113,4 $\pm$ 8,0

Tab. 22. Einfluß steigender Zn-Gaben auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Zn/Liter	Kulturdauer in Tagen							
	4		6		8		10	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	—	—	—	—	—	—	125	11,5
20 $\gamma$	117	4,7	375	7,8	387	7,3	546	8,0
40 $\gamma$	353	7,0	570	7,3	666	7,3	800	7,8
60 $\gamma$	570	7,2	750	7,6	800	7,3	800	7,5
200 $\gamma$	500	5,0	632	5,4	750	6,4	750	6,9
10 mg	500	5,7	750	5,8	706	5,9	750	6,6

Tab. 23. Einfluß steigender Zn-Gaben auf den Amylasegehalt des Myzels von 25 ml Medium

Zn/Liter	intrazelluläre Aktivität (cd) nach Tagen			
	4	6	8	10
20 $\gamma$	25	30	25	32
40 $\gamma$	72	64	62	37
60 $\gamma$	84	80	67	41
200 $\gamma$	110	95	50	28
10 mg	110	83	52	32

Tab. 24. Einfluß des Zn auf die Bildung proteolytischer Enzyme

Zn/Liter	Proteolytische Aktivität (log I <sub>0</sub> /I)				
	der Kulturfiltrate bei steigenden Zn-Gaben				
Tage	20 $\gamma$	40 $\gamma$	60 $\gamma$	200 $\gamma$	10 mg
6	0,0	0,0	0,025	0,44	0,42
8	0,0	0,0	0,070	0,38	0,42

### c) Besprechung der Ergebnisse

**Morphologische Merkmale:** Im gereinigten Medium, dem alle Spurenelemente außer Zink beigefügt wurden, bildete sich nur wenig submerses Myzel ohne Konidien. Mit 4 und 10  $\gamma$  Zn-Zusatz pro Liter wurde zwar noch vorwiegend submerses Myzel, daneben aber auch schon Oberflächenmyzel gebildet. Letzteres zeigte sich vor allem entlang den Glaswänden der Kulturkolben, sowie in Form von inselförmigen Erhebungen auf der Flüssigkeitsoberfläche. Konidien waren bei den letztgenannten Zn-Konzentrationen praktisch noch nicht vorhanden.

Mit 20 und 40  $\gamma$  Zn pro Liter bildeten sich dünne, aber geschlossene Myzeldecken mit wenig Konidien. Die spärlichen Konidien waren gelb, während sie bei optimaler Zn-Versorgung einen grünbraunen Farbton aufweisen. Bei 100  $\gamma$  Zn/Liter blieb die Konidienbildung anfänglich hinter den Varianten mit 200  $\gamma$  und 1 mg Zn/Liter zurück, doch war der Rückstand nach 7-tägiger Kulturdauer aufgeholt.

Die rascheste Decken- und Konidienbildung erfolgte bei den Varianten mit 200  $\gamma$  und 1 mg Zn/Liter. Zur Ausbildung der genannten Merkmale ist also eine Zn-Konzentration zwischen 200  $\gamma$  und 1 mg/Liter als optimal zu betrachten.

Bei den höchsten Zn-Konzentrationen von 10 und 100 mg/Liter war die Konidienbildung deutlich gehemmt. Zudem waren die Myzeldecken nicht so homogen ausgebildet wie bei optimaler Zn-Konzentration.

**Myzelausbeute:** Tab. 19 und 21 zeigen, daß der Myzelertrag mit steigender Zinkabgabe zunimmt, im Bereich von 200  $\gamma$  und 10 mg Zink/Liter ein breites Maximum aufweist und mit 100 mg Zn/Liter wieder etwas absinkt. 100 mg Zn/Liter wirken sich vor allem in der Induktionsphase hemmend auf die Myzelbildung aus. So beträgt die Myzelausbeute mit 1 mg Zn/Liter nach 3 Tagen 35 mg/25 ml Nährlösung, während bei 100 mg Zn/Liter der Myzelertrag nach gleicher Kulturdauer nur 23,5 mg/25 ml Nährlösung erreicht. Aber auch nach längerer Kulturdauer fällt der Myzelertrag bei 100 mg Zn/Liter niedriger aus als mit 200  $\gamma$ , 1 mg und 10 mg Zn/Liter.

Bei den Zink-Mangelvarianten fällt auf, daß der Myzelertrag über die ganze Kulturdauer hinweg zunimmt, während bei optimaler Zn-Versorgung nach 5—6 tägiger Kulturdauer ein Maximum erreicht wird und anschließend der Myzelertrag stationär bleibt oder infolge Autolyse wieder abnimmt. Das langsame stetige Wachstum bei Zn-Mangel könnte eventuell folgendermaßen erklärt werden: Das Zink wirkt im intermediären Stoffwechsel nur teilweise in festgebundener Form, z. B. als integrierender Bestandteil von Enzymen. Im übrigen scheint das Zink innerhalb der Assimilationsprozesse in freier Form zu wirken, z. B. als Aktivator von Enzymsystemen, der immer wieder zu neuer Myzelbildung zur Verfügung steht, so daß ein wohl langsames, aber stetiges Wachstum ermöglicht wird. Es ist nicht anzunehmen, daß im Verlaufe der Kulturdauer ständig soviel Zn vom Glas der Kulturkolben abgegeben wird, wie eine fortgesetzte Myzelbildung im festgestellten Ausmaße benötigen würde. Ständiges Freiwerden von fest gebundenem Zink durch fortwährende Autolyse ist ebenfalls unwahrscheinlich.

**Bildung dextrinogener Amylase:** Die Amylaseausbeute nimmt mit steigender Zinkkonzentration zu, erreicht ein Maximum zwischen 60  $\gamma$  und 200  $\gamma$  Zn/Liter und sinkt bei den höheren Zinkkonzentrationen wieder ab. So beträgt die Aktivität der Kulturfiltrate bei 100  $\gamma$  und 200  $\gamma$  Zn/Liter je 1000 Einheiten nach 7tägiger Kulturdauer, bei 1 mg und 10 mg Zn/Liter hingegen nur noch 800 Einheiten und fällt bei 100 mg Zn/Liter auf 750 Einheiten ab (vgl. 1. Versuch Tab. 20). Auch aus dem 2. Versuch (Tab. 22) geht hervor, daß die maximale Amylaseausbeute bei einer Zinkgabe erreicht wird, welche für Wachstum und Konidienbildung als suboptimal zu betrachten ist.

Myzel- und Amylasebildung sind also nicht gekoppelt. Diese Tatsache geht besonders deutlich aus der spezifischen dextrinogenen Aktivität (cd/MTG) hervor. Höchste spezifische Aktivität ergibt sich im 1. Versuch bei 0 (cd/MTG = 10,0) und bei 4  $\gamma$  Zn (cd/MTG = 10,2) und nimmt mit steigender

Zn-Konzentration ab (vgl. Tab. 20). Auch im 2. Versuch fallen die spezifischen Aktivitäten bei 20  $\gamma$ , 40  $\gamma$  und 60  $\gamma$  Zn/Liter höher aus als diejenigen bei 200  $\gamma$  und 10 mg Zn/Liter (vgl. Tab. 22).

Verfolgt man Myzelbildung und amylytische Aktivität im Verlaufe der Kulturdauer, so zeigt sich, daß diese beiden Größen nicht parallel verlaufen, sondern daß die dextrinogene Aktivität der Kulturfiltrate im Autolysestadium noch zunimmt.

Aus der Bestimmung der intrazellulären Amylase im 2. Versuch (Tab. 23) ergibt sich, daß die nach Erreichen des Wachstumsmaximums noch gebildete Amylase nur zu einem kleinen Teil auf das durch Autolyse bedingte Freiwerden intrazellulärer Amylase zurückzuführen ist. Wie Tab. 23 zeigt, ist der Amylasegehalt des Myzels überhaupt sehr gering, verglichen mit demjenigen des Kulturfiltrates. Er ist im jungen Myzel etwas höher als im alten und beträgt nach 10tägiger Kulturdauer zwischen 20 und 40 Einheiten oder 3—6% der extrazellulären Amylase.

Vergleicht man die intrazelluläre amylytische Aktivität der 10tägigen Myzelien der verschiedenen Zinkkonzentrationen, so sieht man, daß bei der für Myzelbildung suboptimalen Konzentration von 60  $\gamma$  Zn/Liter der Amylasegehalt des Myzels am höchsten ist. Der bereits erwähnte Effekt, wonach leichter Zinkmangel optimale extrazelluläre Amylaseausbeute ergibt, gilt also auch für intrazelluläre Amylase und somit für die gesamte Amylaseausbeute. Er läßt sich deshalb nicht nur als eine Verschiebung zwischen intra- und extrazellulärem Amylasegehalt erklären.

Proteolytische Aktivität: Tab. 24 läßt erkennen, daß die 6- und 8tägigen Kulturfiltrate der Varianten mit 20  $\gamma$  und 40  $\gamma$  Zn/Liter keine meßbare proteolytische Aktivität aufweisen. Selbst bei der Zinkkonzentration von 60  $\gamma$ /Liter, welche annähernd maximalen Myzelertrag ergibt, ist die proteolytische Aktivität des Kulturfiltrates nur geringfügig, verglichen mit derjenigen von 200  $\gamma$  und 10 mg Zn/Liter. Im Kulturfiltrat zeigt sich also erst dann eine nennenswerte proteolytische Aktivität, wenn die Zinkkonzentration für maximale Myzelbildung ausreicht. Die Bildung von Proteasen in Abhängigkeit von der Zinkkonzentration verläuft also ebenfalls nicht parallel zur Myzelbildung. Das Verhältnis proteolytische Aktivität/MTG ist jedoch gerade umgekehrt wie das Verhältnis cd/MTG bei den verschiedenen Zinkkonzentrationen.

Das Zink scheint also an der Synthese dextrinogener Amylase nicht direkt beteiligt zu sein, da bei Zinkmangel im Verhältnis zum Myzelertrag mehr Amylase gebildet wird als bei optimaler Zinkversorgung. Wie bereits erwähnt, haben BERTRAND und DE WOLF (1958) einen analogen Effekt betreffend Saccharasebildung und Zinkmangel bei *A. niger* festgestellt. Hingegen ist Zink erforderlich zur Bildung von Proteasen, wobei eine Mindestkonzentration an Zink vorhanden sein muß, bis überhaupt Proteasen meßbar werden.

Es sei an dieser Stelle nochmals erwähnt, daß GORBACH und KOCH (1955) bei *A. niger* dieselbe Abhängigkeit der Proteasebildung von der Zinkkonzentration festgestellt haben. Sie sprechen in diesem Zusammenhang von einem „Schwellenwert“.

### 3. Einfluß von Eisen

#### a) Ergebnisse des 1. Versuches

Tab. 25. Einfluß steigender Fe-Gaben auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus vier Parallelen

Fe/Liter	Myzeltrockengewicht nach Tagen				
	3	4	5	6	7
0	36,1	50,7 ± 2,5	63,4 ± 6,4	77,7 ± 4,3	92,2 ± 6,1
4 γ	30,5	51,4 ± 1,1	81,0 ± 1,8	80,4 ± 2,9	114,2 ± 3,1
10 γ	35,5	70,8 ± 4,7	82,0 ± 5,9	112,9 ± 10,2	116,1 ± 2,4
20 γ	38,0	75,3 ± 2,4	105,7 ± 4,9	168,7 ± 11,8	123,6 ± 2,3
40 γ	33,1	95,0 ± 6,0	128,2 ± 2,5	135,2 ± 5,6	122,2 ± 2,0
100 γ	44,1	102,9 ± 5,6	144,1 ± 3,7	151,2 ± 3,1	132,4 ± 2,1
200 γ	50,4	115,9 ± 1,4	140,6 ± 3,7	129,2 ± 1,4	135,0 ± 2,5
1 mg	39,4	101,3 ± 1,7	150,5 ± 3,1	147,5 ± 8,2	151,5 ± 5,0
10 mg	40,1	100,3 ± 4,9	160,8 ± 2,3	125,1 ± 1,5	127,8 ± 4,0
100 mg	27,3	59,2 ± 6,2	105,3 ± 4,4	120,4 ± 1,8	124,4 ± 2,5

Tab. 26. Einfluß des Fe auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Fe/Liter	Kulturdauer in Tagen							
	4		5		6		7	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	235	4,6	333	3,95	398	5,1	414	4,5
4 γ	250	4,9	428	5,3	400	5,0	428	3,8
10 γ	375	5,3	462	5,6	424	3,7	462	4,0
20 γ	428	5,7	546	5,2	428	2,5	500	4,05
40 γ	444	4,7	—	—	546	4,05	570	4,65
100 γ	500	4,9	632	4,4	578	3,85	632	4,80
200 γ	522	4,5	666	4,75	616	4,80	666	4,95
1 mg	546	5,4	750	5,0	650	4,40	706	4,70
10 mg	632	6,3	800	5,0	640	5,15	706	5,5
100 mg	480	8,1	750	7,15	728	6,05	856	6,90

#### b) Ergebnisse des 2. Versuches

Tab. 27. Einfluß steigender Fe-Gaben auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus zwei Parallelen

Fe/Liter	Myzeltrockengewicht nach Tagen				
	3	4	6	8	10
0	7,9	20,9 ± 0,3	28,9 ± 2,7	30,8 ± 0,6	37,8 ± 2,6
20 γ	33,9	50,1 ± 1,1	56,6 ± 0,6	62,0 ± 1,0	81,0 ± 5,0
200 γ	78,0 ± 1,8	124,5 ± 2,5	127,3 ± 0,7	125,0 ± 0,2	125,7 ± 0,1
10 mg	70,4 ± 7,8	119,9 ± 0,7	132,4 ± 3,2	126,5 ± 3,1	120,0 ± 11,4
100 mg	19,9	58,0 ± 17,2	106,3 ± 2,1	117,4 ± 1,4	116,2 ± 7,6

Tab. 27 a. Einfluß von gleichzeitig überoptimalen Fe- und Zn-Zusätzen auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus zwei Parallelen

	Myzeltrockengewicht nach Tagen	
	6	8
100 mg Fe + 100 mg Zn/Liter. .	130,0 ± 5,0	115,6 ± 0,2

Tab. 28. Einfluß des Fe auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Fe/Liter	Kulturdauer in Tagen							
	4		6		8		10	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	94	4,6	136	4,7	171	5,5	226	6,0
20 $\gamma$	176	3,5	324	5,7	333	5,4	352	4,4
200 $\gamma$	500	4,0	666	5,2	706	5,7	750	6,0
10 mg	546	4,6	706	5,4	800	6,4	800	6,7
100 mg	400	6,9	750	7,1	1000	8,5	925	8,0

Tab. 28 a. Einfluß von gleichzeitig überoptimalen Fe- und Zn-Zusätzen auf die dextrinogene Aktivität des Kulturfiltrates

	Kulturdauer in Tagen			
	6		8	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
100 mg Fe + 100 mg Zn/Liter . .	750	5,8	800	6,85

Tab. 29. Einfluß steigender Fe-Gaben auf den Amylasegehalt des Myzels von 25 ml Medium

Fe/Liter	intrazelluläre Aktivität (cd) nach			
	4	6	8	10 Tagen
0	14	14	13	14
20 $\gamma$	55	38	36	38
200 $\gamma$	71	56	38	28
10 mg	67	59	34	27
100 mg	56	36	32	25

Tab. 30. Einfluß des Eisens auf die Bildung proteolytischer Enzyme

Tage	Fe/Liter	Proteolytische Aktivität ( $\log I_0/I$ ) der Kulturfiltrate bei steigenden Fe-Gaben				
		0	20 $\gamma$	200 $\gamma$	10 mg	100 mg
6		0,000	0,010	0,300	0,375	0,430
8		0,000	0,020	0,320	0,340	0,560

### c) Besprechung der Ergebnisse

**Morphologische Merkmale:** Rascheste Decken- und Konidienbildung erfolgte mit 1 mg und 10 mg Fe-Zusatz pro Liter. Mit 200  $\gamma$  Fe/Liter setzte die Konidienbildung etwas später ein als bei den nächsthöheren Konzentrationen. Der anfängliche Rückstand war jedoch nach 7 tägiger Kulturdauer aufgeholt. 100  $\gamma$  Fe/Liter sind für die Konidienbildung bereits als suboptimal zu bezeichnen. Bei den noch niedrigeren Fe-Konzentrationen werden praktisch überhaupt keine Konidien mehr gebildet. 100 mg Fe/Liter wirken hemmend auf die Konidienbildung, jedoch nicht in gleichem Ausmaße wie 100 mg Zink/Liter.



**Myzel ausbeute:** Tab. 25 und 27 zeigen, daß der Myzelertrag mit steigenden Fe-Konzentrationen zunimmt, ein breites Optimum zwischen 100  $\gamma$  und 10 mg Fe/Liter aufweist und mit 100 mg Fe/Liter wieder absinkt. Das Eisen wird also für optimales Wachstum in ungefähr gleicher Konzentration benötigt wie das Zink. Berücksichtigt man die höheren Nullwerte für Eisen gegenüber denjenigen von Zink, so ergibt sich, daß etwas höhere Fe-Konzentrationen für optimalen Myzelertrag erforderlich sind als Zn-Konzentrationen.

100 mg Fe/Liter hemmen das Wachstum vor allem in der Induktionsphase. So beträgt der Myzelertrag mit 100 mg Fe/Liter nach 3-tägiger Kulturdauer nur 27,3 mg/25 ml Nährlösung, während beispielsweise mit 200  $\gamma$  Fe/Liter (Tab. 22) ein Myzelertrag von 50,4 mg/25 ml erreicht wird.

Beide Versuche zeigen, daß der Myzelertrag bei den Fe-Mangelvarianten über die ganze Kulturdauer hinweg zunimmt. Es wird kein Maximum erreicht wie bei den Varianten optimaler Fe-Konzentration. Mögliche Deutungen für das langsame, stetige Wachstum bei Spurenelementmangel wurden bereits bei Besprechung der Zinkversuche (s. S. 79) gegeben.

**Bildung dextrinogener Amylase:** Bei beiden Versuchen nimmt die Bildung dextrinogener Amylase mit steigender Fe-Konzentration zu. Es wird kein Optimum erreicht wie im Falle des Zn, sondern selbst bei der höchsten bereits wachstumshemmenden Fe-Konzentration ist noch eine vermehrte Amylasebildung festzustellen. So beträgt die Zunahme der extrazellulären amylolytischen Aktivität von 10 mg zu 100 mg Fe/Liter im 1. Versuch (Tab. 26) nach 7-tägiger Kulturdauer 150 Einheiten, im 2. Versuch (Tab. 28) nach 8-tägiger Kulturdauer 200 Einheiten.

Aus diesem Grunde ergibt sich bei den höchsten Fe-Konzentrationen auch die höchste spezifische Aktivität, während sie im Bereich von 0—1 mg Fe/Liter, abgesehen von großen Schwankungen, konstant ist (Tab. 26).

Wie aus Tab. 29 hervorgeht, fällt auch hier die intrazelluläre Amylase nicht ins Gewicht gegenüber der extrazellulären. Der Amylasegehalt ist im jungen Myzel wiederum etwas höher als im alten. So beträgt die intrazelluläre dextrinogene Aktivität bei 200  $\gamma$  Fe/Liter nach 4-tägiger Kulturdauer 71 Einheiten und sinkt nach 10-tägiger Kulturdauer auf 28 Einheiten ab. Bei den übrigen Fe-Konzentrationen schwankt die intrazelluläre Aktivität nach 10-tägiger Kulturdauer zwischen 14 und 38 Einheiten und ist somit von der gleichen Größenordnung wie bei den verschiedenen Zink-Konzentrationen.

**Proteolytische Aktivität:** Tab. 30 zeigt, daß das Kulturfiltrat des Fe-Nullwertes nach 6- und 8-tägiger Kulturdauer keine meßbare proteolytische Aktivität aufweist. Mit 20  $\gamma$  Fe/Liter werden praktisch ebenfalls noch keine Proteasen gebildet. Eine nennenswerte proteolytische Aktivität ist erst bei der für optimales Wachstum erforderlichen Fe-Konzentration von 200  $\gamma$ /Liter feststellbar.

Die Bildung von Proteasen ist also in ähnlicher Weise von der Fe-Konzentration abhängig wie von der Zinkkonzentration. Die beiden Elemente Fe und Zn müssen in für das Wachstum optimaler Konzentration vorhanden sein, damit überhaupt Proteasen gebildet werden.

Während jedoch beim Zink mit 200  $\gamma$ /Liter maximale proteolytische Aktivität erreicht wurde, kann die Proteasebildung durch höhere Fe-Zusätze

noch beträchtlich gefördert werden. Sie beträgt im 8 tägigen Kulturfiltrat mit 100 mg Fe/Liter 175% derjenigen mit 200  $\gamma$  Fe/Liter.

In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß die höchste bereits wachstumshemmende Fe-Konzentration von 100 mg/Liter sich auch fördernd auf die Amylasebildung ausgewirkt hatte.

Einfluß hoher Zn- und Fe-Konzentrationen auf Wachstum und Amylasebildung: Im 2. Versuch wurde in einer Variante der Nährlösung gleichzeitig 100 mg Fe und 100 mg Zn beigelegt. Einzel-Zusätze der beiden Elemente in der angegebenen Konzentration hatten sich bekanntlich hemmend auf Myzel- und Konidienbildung ausgewirkt. Durch alleinigen hohen Zn-Zusatz war die Amylasebildung gehemmt, mit ausschließlichem hohen Fe-Zusatz hingegen gefördert worden.

Die hemmende Wirkung der hohen Einzelgaben wird für Myzel- und Konidienbildung durch gleichzeitige hohe Fe- und Zn-Konzentrationen aufgehoben (vgl. Tab. 27 a).

Die vermehrte Amylasebildung bei 100 mg Fe/Liter (1000 Einheiten) wird durch ebenso hohe Zinkkonzentration reduziert (800 Einheiten) (vgl. Tab. 28 a).

#### 4. Einfluß von Kupfer

##### a) Ergebnisse des 1. Versuches

Tab. 31. Einfluß steigender Cu-Gaben auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus vier Parallelen

Cu/Liter	Myzeltrockengewicht nach Tagen				
	3	4	5	6	7
0	20,7	69,3 $\pm$ 10,6	96,8 $\pm$ 6,6	63,8 $\pm$ 4,1	71,4 $\pm$ 6,6
2 $\gamma$	26,8	68,4 $\pm$ 2,1	85,9 $\pm$ 7,2	68,8 $\pm$ 6,5	52,3 $\pm$ 3,3
4 $\gamma$	34,6	93,0 $\pm$ 7,6	100,5 $\pm$ 5,0	83,8 $\pm$ 3,6	81,7 $\pm$ 2,7
10 $\gamma$	44,1	106,3 $\pm$ 3,4	130,8 $\pm$ 3,5	113,7 $\pm$ 2,8	103,1 $\pm$ 2,8
20 $\gamma$	50,2	132,3 $\pm$ 2,0	127,2 $\pm$ 3,0	167,6 $\pm$ 13,1	120,2 $\pm$ 1,7
40 $\gamma$	68,2	138,6 $\pm$ 3,9	145,5 $\pm$ 2,1	155,2 $\pm$ 6,2	126,4 $\pm$ 2,4
100 $\gamma$	68,0	148,7 $\pm$ 3,5	153,9 $\pm$ 5,5	132,5 $\pm$ 1,0	128,5 $\pm$ 1,0
200 $\gamma$	57,1	133,8 $\pm$ 3,1	180,2 $\pm$ 12,2	143,3 $\pm$ 2,9	127,2 $\pm$ 3,1
2 mg	57,0	165,5 $\pm$ 6,0	171,3 $\pm$ 11,7	136,5 $\pm$ 0,6	129,7 $\pm$ 1,5
20 mg	57,0	123,0 $\pm$ 1,0	159,3 $\pm$ 8,9	136,7 $\pm$ 2,8	121,4 $\pm$ 2,6

Tab. 32. Einfluß des Cu auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Cu/Liter	Kulturdauer in Tagen							
	4		5		6		7	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	428	6,2	706	7,3	923	14,4	923	13,0
2 $\gamma$	522	7,6	750	8,8	923	13,4	940	18,0
4 $\gamma$	522	5,6	666	6,3	857	10,2	857	10,5
10 $\gamma$	500	4,7	632	4,8	706	6,2	750	7,3
20 $\gamma$	480	3,6	600	4,7	706	4,2	706	5,9
40 $\gamma$	522	3,8	632	4,4	706	4,6	750	5,9
100 $\gamma$	572	3,9	706	4,6	750	5,6	800	6,3
200 $\gamma$	546	4,1	600	3,3	706	5,0	750	5,9
2 mg	546	3,3	632	3,7	706	5,2	750	5,8
20 mg	522	4,2	572	3,6	706	5,2	750	6,2

b) Ergebnisse des 2. Versuches

Tab. 33. Einfluß von Cu auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus vier Parallelen

Cu/Liter	Myzeltrockengewicht nach Tagen				
	3	4	6	8	10
0	12,5	31,5 ± 1,7	63,4 ± 0,8	72,1 ± 11,5	53,1 ± 0,9
2 γ	14,0	47,9 ± 7,9	82,6 ± 2,0	70,8 ± 0,4	71,3 ± 0,9
4 γ	22,5	64,8 ± 0,8	91,6 ± 1,8	87,0 ± 7,0	90,7 ± 7,9
100 γ	23,6	100,9 ± 2,5	134,3 ± 1,1	127,9 ± 2,3	130,9 ± 4,5
40 mg	14,0	90,1 ± 0,1	127,8 ± 0,4	114,4 ± 0,8	121,5 ± 0,5

Tab. 33 a. Einfluß der Kombination Cu-Mangel und hoher Fe-Konzentration auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml

	Myzeltrockengewicht nach Tagen	
	8	10
0 Cu + 100 mg Fe/Liter . . . . .	69,3 ± 0,7	58,3 ± 5,9

Tab. 34. Einfluß des Cu auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Cu/Liter	Kulturdauer in Tagen							
	4		6		8		10	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	320	9,5	800	12,6	922	12,8	1000	18,8
2 γ	430	9,0	750	9,2	856	12,1	856	12,1
4 γ	522	8,1	800	8,7	810	9,3	820	9,2
100 γ	522	5,2	666	5,0	706	5,5	725	5,6
40 mg	546	6,0	666	5,2	706	6,2	750	6,2

Tab. 34 a. Einfluß der Kombination Cu-Mangel und hoher Fe-Konzentration auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat

	Kulturdauer in Tagen			
	8		10	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0 Cu + 100 mg Fe/Liter . . . . .	856	12,5	856	14,8

Tab. 35. Einfluß steigender Cu-Gaben auf den Amylasegehalt des Myzels pro 25 ml Medium

Tage	Cu/Liter	intrazelluläre Aktivität (cd) bei steigender Cu-Gabe				
		0	2 γ	4 γ	100 γ	40 mg
8		22	25	26	34	51
10		18	18	24	29	43

Tab. 36. Einfluß des Cu auf die Bildung proteolytischer Enzyme bei steigenden Cu-Gaben

Tage \ Cu/Liter	Proteolytische Aktivität ( $\log I_0/I$ ) im Kulturfiltrat bei steigender Cu-Gabe				
	0	2 $\gamma$	4 $\gamma$	100 $\gamma$	40 mg
6	0,55	0,48	0,42	0,28	0,44
8	0,72	0,56	0,55	0,36	0,40

## c) Besprechung der Ergebnisse

**Morphologische Merkmale:** Rascheste Decken- und Konidienbildung erfolgte bei den Varianten mit 40  $\gamma$ , 100  $\gamma$  und 200  $\gamma$  Cu/Liter. Bei den niedrigeren Cu-Gaben bildeten sich mit sinkender Konzentration abgestufte Mangelmyzelien, unvollständig geschlossene oder nur dünne Decken mit wenig Konidien. Die Konidienfarbe war in diesen Mangelvarianten ein leuchtendes Gelb im Unterschied zur flaschen- bis braungrünen Farbe bei optimaler Cu-Versorgung. 2 und 20 mg Cu/Liter wirkten sich verzögernd auf Konidien- und Deckenbildung aus. Am Ende der Inkubationszeit zeigte sich indessen gegenüber den Varianten mit 40  $\gamma$ , 100  $\gamma$ , 200  $\gamma$  Cu/Liter kein Unterschied mehr in der Ausbildung der genannten Merkmale. Die höchste angewendete Cu-Konzentration von 40 mg/Liter im 2. Versuch wirkte sich dagegen ausgeprägt hemmend auf die Konidienbildung aus.

**Myzelausbeute:** Tab. 31 und 33 zeigen, daß die Myzelausbeute mit steigender Cu-Konzentration zunimmt. Die maximalen Ausbeuten an Myzeltrockengewicht werden bei 40  $\gamma$  bis 20 mg Cu/Liter nach 5—6 tägiger Kulturdauer erreicht. 40 mg Cu/Liter hemmen das Wachstum in der Induktionsphase (Tab. 33). Nach 3 tägiger Kulturdauer beträgt der Myzelertrag 14 mg/25 ml, während mit 100  $\gamma$  Cu/Liter 23,6 mg/25 ml erreicht werden. Auch im weiteren Wachstumsverlauf fällt der Myzelertrag mit 40 mg Cu/Liter durchweg etwas geringer aus als mit 100  $\gamma$  Cu/Liter.

Der Wachstumsverlauf bei Cu-Mangel ist grundsätzlich verschieden von demjenigen bei Zn- und Fe-Mangel. Nach Erreichen eines Maximums tritt bei Cu-Mangel Autolyse ein, wie in einem kompletten Medium, während bei Zn- und Fe-Mangel selbst nach 10 tägiger Kulturdauer immer noch stetig ansteigendes Wachstum festgestellt werden kann (vgl. Tab. 19 und 25). Wahrscheinlich besteht die Erklärung darin, daß alles Cu in festgebundener Form am Myzelaufbau beteiligt ist und das Wachstum aufhört, wenn der Vorrat an diesem Spurenelement in der Nährlösung verbraucht ist.

**Bildung dextrinogener Amylase:** Beide Versuche (Tab. 32 und 34) ergeben übereinstimmend, daß Cu-Mangel die Amylasebildung fördert. Die höchsten cd-Werte werden in der Nullvariante erhalten sowie bei der tiefsten Cu-Konzentration von 2  $\gamma$  Cu/Liter. Die dextrinogene Aktivität nimmt bis zum Zusatz von 10  $\gamma$  Cu/Liter um rund 200 Einheiten ab. Höhere Cu-Gaben bis zur Konzentration von 40 mg/Liter bewirken keine weitere Aktivitätsabnahme. Die Amylasebildung wird also durch eine Cu-Konzentration gehemmt, welche für das Wachstum optimal ist.

Aus den Werten der spezifischen dextrinogenen Aktivität (Tab. 32 und 34) geht besonders deutlich hervor, daß Myzel und Amylasebildung in Abhängigkeit von der Cu-Konzentration nicht parallel verlaufen. So beträgt im 2. Versuch (Tab. 34) die spezifische dextrinogene

Aktivität nach 10 tägiger Kulturdauer beim Cu-Nullwert 18,8, bei 100  $\gamma$  Cu/Liter hingegen nur 5,6. Bei ausgeprägtem Cu-Mangel wird also im Verhältnis zum Myzelertrag rund dreimal mehr Amylase gebildet als bei wachstumsoptimaler Cu-Konzentration.

Die intrazelluläre dextrinogene Aktivität beträgt bei 100  $\gamma$  und 40 mg Cu/Liter rund das Doppelte der Varianten mit 0 und 2  $\gamma$  Cu-Zusatz pro Liter (Tab. 35). Der Amylasegehalt der Myzelien ist jedoch bei allen Cu-Konzentrationen so niedrig, daß er gegenüber der extrazellulären Amylase vernachlässigt werden kann.

Um abzuklären, ob sich durch eine Kombination von Cu-Mangel und hoher Eisenkonzentration die Amylaseausbeute noch erhöhen ließe, wurde im 2. Versuch als zusätzliche Variante das Cu-Mangel-Medium mit 100 mg Fe/Liter versetzt. Diese Eisenmenge hatte einerseits das Wachstum gehemmt, andererseits die Amylasebildung gefördert. Wie aus Tab. 34a hervorgeht, wirkten sich die beiden Einzeleffekte durch Kombination nicht kumulierend aus.

In diesem Zusammenhang sei nochmals erwähnt, daß Cu die Amylasebildung bei *Trichoderma viride* hemmt (MANDELS und REESE 1957).

Proteolytische Aktivität: Tab. 36 läßt erkennen, daß sich Cu-Mangel auch fördernd auf die Bildung proteolytischer Enzyme auswirkt. Die höchste proteolytische Aktivität weist das Kulturfiltrat des Cu-Nullwertes auf. Die Aktivität sinkt mit steigender Cu-Gabe, erreicht mit 100  $\gamma$  Cu/Liter ein Minimum und nimmt mit 40 mg Cu/Liter wieder zu.

Die Bildung proteolytischer Enzyme ist also in ähnlicher Weise vom Cu abhängig wie die Bildung amylytischer Enzyme.

Aus den Ergebnissen betreffend Amylase- und Proteasebildung in Abhängigkeit von der Cu-Konzentration folgt, daß Cu offenbar nicht an der Synthese dieser Enzyme beteiligt ist.

##### 5. Einfluß von Mangan

Mit der beschriebenen Extraktionsmethode gelang es nicht, das Mn so weit aus der Nährlösung zu entfernen, daß typische Mangelercheinungen auftraten. Im 1. Versuch ergaben deshalb steigende Mn-Zusätze von 0—20 mg/Liter keine merklichen Unterschiede im Myzelertrag. Lediglich die Konidienbildung war anfänglich bei der Mn-Nullvariante etwas verzögert. Im aufgeführten Konzentrationsbereich war auch kein Einfluß des Mn auf die Amylasebildung festzustellen.

Im 2. Versuch wurde die Mn-Konzentration bis auf 40 mg pro Liter erhöht. Die Ergebnisse dieses 2. Versuches betreffend Myzelertrag sowie Bildung amylytischer und proteolytischer Enzyme sind in Tab. 37, 38 und 39 zusammengestellt.

Tab. 37. Einfluß steigender Mn-Gaben auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium

Mn/Liter	Myzeltrockengewicht nach Tagen				
	3	4	6	8	10
o	43,8	102,8 $\pm$ 11,2	123,5 $\pm$ 3,5	122,0 $\pm$ 2,0	120,2 $\pm$ 5,8
2 $\gamma$	41,2	103,6 $\pm$ 3,0	123,5 $\pm$ 2,5	120,2 $\pm$ 0,4	119,3 $\pm$ 2,3
40 $\gamma$	46,2	99,8 $\pm$ 2,4	128,0 $\pm$ 1,0	123,2 $\pm$ 1,4	120,7 $\pm$ 0,3
2 mg	51,5	109,4 $\pm$ 2,4	129,4 $\pm$ 1,6	122,1 $\pm$ 0,1	121,8 $\pm$ 2,4
40 mg	26,2	95,3 $\pm$ 1,7	143,0 $\pm$ 1,0	123,0 $\pm$ 1,0	126,1 $\pm$ 3,7

Tab. 38. Einfluß von Mn auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Mn/Liter	Kulturdauer in Tagen							
	4		6		8		10	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	546	5,3	706	5,8	715	5,8	715	6,0
2 $\gamma$	600	5,8	706	6,1	750	5,9	750	6,3
40 $\gamma$	600	6,0	725	5,9	750	5,9	750	6,3
2 mg	570	5,2	666	5,8	750	5,4	750	6,1
40 mg	500	5,3	632	4,7	666	5,1	632	5,0

Tab. 39. Einfluß des Mn auf die Bildung proteolytischer Enzyme

Tage	Mn/Liter	Proteolytische Aktivität im Kulturfiltrat bei steigender Mn-Gabe (log I <sub>0</sub> /I)				
		0	2 $\gamma$	40 $\gamma$	2 mg	40 mg
6		0,36	0,45	0,46	0,43	0,31
8		0,40	0,43	0,43	0,45	0,26

### Besprechung der Ergebnisse

Auch im 2. Versuch ohne Mn-Zusatz wird ein maximaler Myzel-ertrag erreicht (Tab. 37). Die Myzelausbeute ist bei 0 und 2  $\gamma$  Mn-Zusatz pro Liter nach 3 tägiger Kulturdauer wohl noch etwas niedriger als in den Varianten mit 40  $\gamma$  und 2 mg Mn pro Liter; nach 4 tägiger Kulturdauer ist indessen kein Unterschied mehr festzustellen. Wie schon im 1. Versuch, setzte die Konidienbildung beim Nullwert und der Variante mit 2  $\gamma$  Mn-Zusatz etwas später ein als bei den nächsthöheren Konzentrationen. Offenbar bleibt also nach erfolgter Reinigung der Nährlösung gerade noch soviel Mn zurück, als der für Wachstum und Konidienbildung unteren optimalen Grenze entspricht. Im 1. Versuch war bis zur Konzentration von 20 mg Mn/Liter keine Wachstumshemmung beobachtet worden. Wie man aus Tab. 37 ersieht, wirken 40 mg Mn/Liter in der Induktionsphase wachstumshemmend. Nach 3 tägiger Kulturdauer beträgt die Myzelausbeute bei 40 mg Mn/Liter nur die Hälfte derjenigen mit 2 mg Mn/Liter, nach 6 tägiger Kulturdauer hingegen wird eine höhere Myzelausbeute erreicht als bei allen übrigen Varianten.

Die Amylaseausbeute war im 1. Versuch bei allen Mn-Konzentrationen von 0—20 mg/Liter konstant. Die Bildung dextrinogener Amylase wird bei 40 mg Mn/Liter gehemmt (Fig. 38). Die dextrinogene Aktivität ist aber bei dieser Konzentration nach 10 tägiger Kulturdauer nur um 120 Einheiten geringer als bei den übrigen Varianten. Der Mn-Nullwert weist für Amylaseausbeute ebenfalls leicht sinkende Tendenz auf. Die Unterschiede sind allerdings nur geringfügig und waren, wie bereits erwähnt, im 1. Versuch nicht zu beobachten.

Tab. 39 läßt erkennen, daß die proteolytische Aktivität im Kulturfiltrat bei 40 mg Mn/Liter geringer ausfällt als im Bereich von 2  $\gamma$ —2 mg Mn/Liter. Die proteolytische Aktivität ist im letztgenannten konstant und nimmt in der Nullvariante wieder etwas ab.

6. Einfluß von Magnesium

a) Allgemeines

Das Magnesium ist kein eigentliches Spurenelement, sondern nimmt eine Mittelstellung zwischen den Makro- und Mikrobestandteilen einer Nährlösung ein. Die hervorragende Bedeutung dieses Elements als Aktivator vieler Enzymsysteme ist bekannt. Im Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen sei besonders die aktivierende Funktion des Mg bei den durch die Transphosphatase katalysierten Übertragungsreaktionen erwähnt. Nach SIMKIN (1959) werden durch derartige Übertragungsreaktionen auch die Aminosäuren aktiviert und damit die Bildung von Peptidbindungen ermöglicht. Die aktivierende Rolle des Mg bei den Beladungsreaktionen der Aminosäuren unter Mitwirkung des ATP/ADP Systems wurde schon wiederholt festgestellt (vgl. DIXON 1958).

Auf Grund dieser Tatsachen schien es interessant, den Einfluß des Mg auf die Bildung amylolytischer und proteolytischer Enzyme bei definierten Spurenelementbedingungen zu untersuchen.

b) Ergebnisse des 1. Versuches

Tab. 40. Einfluß steigender Mg-Gaben auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus vier Parallelen

Mg/Liter mg	Myzeltrockengewicht nach Tagen				
	3	4	5	6	7
0	4,6	9,6	10,9	16,2	15,2
1	28,4	50,6 ± 2,6	55,2 ± 3,7	68,8 ± 3,3	72,3 ± 1,3
2	32,8	66,0 ± 3,1	69,6 ± 3,0	90,5 ± 1,3	95,4 ± 1,8
4	66,2	93,5 ± 11,5	101,9 ± 6,3	106,4 ± 3,9	101,0 ± 1,2
10	65,2	139,3 ± 6,8	117,1 ± 1,0	114,2 ± 1,8	118,3 ± 1,9
30	65,0	144,9 ± 8,0	122,2 ± 1,3	117,0 ± 0,9	118,6 ± 1,4
100	65,1	131,2 ± 1,4	117,2 ± 4,7	120,8 ± 1,7	116,8 ± 1,3
1000	10,7	44,3 ± 10,0	81,5 ± 16,8	23,6	84,3 ± 11,5

Tab. 41. Einfluß des Mg auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Mg/Liter mg	Kulturdauer in Tagen							
	4		5		6		7	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	40	4,1	56	5,3	71	4,4	78	5,1
1	125	2,5	142	2,5	164	2,4	174	2,4
2	154	2,3	200	2,9	222	2,5	245	2,6
4	240	2,6	260	2,6	428	4,0	333	3,3
10	462	3,3	632	5,4	706	6,2	750	6,3
30	500	3,5	666	5,5	800	6,8	706	6,0
100	480	3,7	632	5,4	706	5,8	800	6,9
1000	100	2,3	344	4,2	117	5,1	316	3,7

## c) Ergebnisse des 2. Versuches

Tab. 42. Einfluß des Magnesiums auf das Myzeltrockengewicht in mg/25 ml Medium. Durchschnitt aus zwei Parallelen

Mg/Liter mg	Myzeltrockengewicht nach Tagen				
	3	4	6	8	10
0	—	—	—	—	19,0
1	16,2	46,9 ± 3,5	74,4 ± 2,0	79,4 ± 1,8	84,5 ± 1,9
2	42,5	65,4 ± 0,8	90,8 ± 2,8	92,4 ± 2,4	94,2 ± 3,8
4	61,8	88,8 ± 0,2	106,9 ± 2,3	104,1 ± 2,7	105,1 ± 3,1
6	59,7	95,4 ± 3,8	116,7 ± 2,5	112,1 ± 1,1	113,6 ± 0,4
30	60,3	112,5 ± 1,7	129,1 ± 3,9	128,6 ± 2,6	112,4 ± 0,2

Tab. 43. Einfluß des Mg auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat während des Wachstums

Mg/Liter mg	Kulturdauer in Tagen							
	4		6		8		10	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
0	—	—	—	—	—	—	118	6,2
1	148	3,1	176	2,4	187	2,4	222	2,6
2	207	3,2	235	2,6	250	2,7	300	3,2
4	400	4,5	462	4,3	480	4,6	522	5,0
6	600	6,3	706	6,2	750	6,7	750	6,6
30	666	6,0	856	6,6	856	6,7	856	7,6

Tab. 44. Einfluß des Mg auf den Amylasegehalt des Myzels von 25 ml Medium

Mg/Liter Tage	intrazelluläre Aktivität (cd) bei steigender Mg-Gabe in mg				
	1	2	4	6	30
8	25	27	38	36	31
10	31	29	25	33	30

Tab. 45. Einfluß des Mg auf die Bildung proteolytischer Enzyme

	Mg/Liter Tage	Proteolytische Aktivität im Kulturfiltrat bei steigender Mg-Gabe ( $\log I_0/I$ ) in mg						
		0,5	1	2	4	6	30	60
1. Versuch	6	—	0,40	0,62	1,20	0,95	0,47	—
	8	—	0,35	0,86	1,35	1,00	0,50	—
2. Versuch	6	0,39	0,58	0,67	0,88	1,20	0,81	0,74
	8	0,50	0,62	0,65	1,17	1,34	0,80	0,71

## d) Besprechung der Ergebnisse

Morphologische Merkmale: Rascheste Decken- und Konidienbildung erfolgte bei den Varianten mit 30 und 100 mg Mg/Liter. Für die Konidienbildung sind 10 mg Mg/Liter bereits als suboptimal zu bezeichnen.



Die Konidienbildung setzte nicht nur später ein als bei den erstgenannten Varianten, sondern es wurden überhaupt weniger Konidien gebildet. In den Varianten mit 4, 2 und 1 mg Mg/Liter bildeten sich abgestuft dünnere Myzeldecken, praktisch ohne Konidien. Die geringe Myzelbildung in der Nullvariante war vorwiegend submers.

**Myzelertrag:** Tab. 40 und 42 zeigen, daß die Myzelausbeute mit steigender Mg-Gabe zunimmt. Bei der für Konidienbildung noch suboptimalen Mg-Konzentration von 10 mg/Liter, sowie bei Mg-Gaben von 30 und 100 mg/Liter, wird maximaler Myzelertrag erreicht. Mit 1 g Mg/Liter fällt der Myzelertrag wiederum beträchtlich tiefer aus (Tab. 40). Sodann zeigen sich in dieser Variante große Unterschiede zwischen den einzelnen Kolben (vgl. s.). Das Autoklavieren hatte bei der höchsten Mg-Konzentration (1 g/Liter) starke Ausfällungen zur Folge. Die niedrigen Myzelausbeuten sind deshalb nicht ohne weiteres einer hemmenden Wirkung zu hoher Mg-Konzentrationen zuzuschreiben, sondern es ist denkbar, daß auch Mg gefällt wurde und nicht mehr in optimaler Konzentration in löslicher Form zur Verfügung stand.

Die Ergebnisse beider Versuche lassen erkennen, daß der Myzelertrag bei Mg-Mangel während der ganzen Inkubationszeit zunimmt. So beträgt beispielsweise der Myzelertrag bei 1 mg Mg/Liter nach 3, 4, 6, 8 und 10 Tagen: 16,2, 46,9, 74,4, 79,4 und 84,5 mg/25 ml Nährlösung. Die entsprechenden Myzeltrockengewichte bei 30 mg Mg/Liter im Verlaufe der Kulturdauer sind: 60,3, 112,5, 129,1, 128,6 und 112,4 mg (vgl. Tab. 42). Bei optimaler Mg-Versorgung wird also nach 6 tägiger Kulturdauer ein Maximum erreicht, und nachher nimmt die Myzelausbeute wieder ab. Der Vergleich der Myzeltrockengewichte bei steigender Mg-Konzentration nach 10 tägiger Kulturdauer zeigt, daß schon mit geringem Mg-Zusatz ein relativ hoher Myzelertrag erreicht wird. So ergibt z. B. 1,0 mg Mg/Liter eine Myzelausbeute von 84,5 mg/Kolben; mit 2 und 4 mg Mg/Liter 94,2 und 105,1 mg/Kolben. (Vgl. Tab. 42.) Vom Nullwert zur Variante mit 1 mg Mg/Liter ergibt sich also eine Zunahme der Myzelausbeute um ca. 70 mg/25 ml Nährlösung, während bei doppelter und 4 facher Mg-Konzentration die weitere Zunahme nur noch je ca. 10 mg/25 ml Nährlösung beträgt. Der Verlauf des Wachstums bei Mg-Mangel, sowie die relativ hohen Myzelausbeuten bei geringer Mg-Konzentration stehen mit der Annahme in Einklang, daß das Mg im intermediären Stoffwechsel vorwiegend katalytische Funktionen in freier Form ausübt.

**Bildung dextrinogener Amylase:** Aus Tab. 41 und 43 ersieht man, daß die dextrinogene Aktivität mit steigender Mg-Konzentration zunimmt. Maximale Aktivität wird im Konzentrationsbereich von 10—100 mg Mg/Liter erreicht.

Verfolgt man gleichzeitig Myzel- und Amylasebildung in Abhängigkeit von der Mg-Konzentration, so zeigt sich, daß bei suboptimalen Mg-Konzentrationen relativ zum Myzelertrag weniger Amylase gebildet wird. So beträgt z. B. die spezifische dextrinogene Aktivität bei 1 mg Mg/Liter im 1. Versuch 2,6 nach 7 tägiger Kulturdauer (Tab. 41), im 2. Versuch 2,4 nach 10 tägiger Kulturdauer (Tab. 43), während die spezifische dextrinogene Aktivität bei optimaler Mg-Konzentration zwischen 6,3 und 7,0 liegt. Bei steigender Mg-Gabe wird also primär mehr Myzel gebildet und erst sekundär mehr Amylase. Der Mg-Nullwert stellt eine Ausnahme dar. Die spezifische dextrinogene Aktivität ist in beiden Versuchen

höher als mit 1, 2 und 4 mg Mg/Liter. Wenn also nur Spuren von Mg in der Nährlösung enthalten sind, steigt das Verhältnis  $cd/MTG$  wieder an.

Die intrazelluläre dextrinogene Aktivität ist sehr gering und zwischen den einzelnen Mg-Konzentrationen sind praktisch keine Unterschiede vorhanden (Tab. 44). Der Amylasegehalt des Myzels ist also nicht von der Mg-Konzentration abhängig und kann im Verhältnis zur extrazellulären Amylase vernachlässigt werden.

Proteolytische Aktivität: Tab. 45 läßt erkennen, daß die proteolytische Aktivität der Kulturfiltrate im Konzentrationsbereich von 4—6 mg Mg/Liter am höchsten ist. Der genannte Bereich ist, wie bereits erwähnt, für das Wachstum suboptimal. Bei optimaler Mg-Versorgung (30 mg/Liter) ist die proteolytische Aktivität absolut tiefer. Unter Berücksichtigung der Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Extinktion (vgl. Fig. 3) folgt, daß im Bereich von 4—6 mg Mg/Liter 2—4 mal soviel proteolytische Enzyme gebildet werden wie bei optimaler Mg-Versorgung (30 und 60 mg Mg/Liter). Im Bereich von 0—2 mg Mg/Liter ist die proteolytische Aktivität absolut geringer als bei Mg-Gaben von 4 und 6 mg/Liter; relativ zum Myzelertrag werden jedoch auch im Mg-Mangelbereich von 0—2 mg/Liter mehr proteolytische Enzyme gebildet. Die Bildung proteolytischer Enzyme ist also nicht in gleicher Weise vom Mg-Gehalt des Mediums abhängig wie die Amylasebildung. Mg-Mangel wirkt sich hemmend auf die Amylasebildung, jedoch fördernd auf die Proteasebildung aus.

#### 7. Einfluß höherer Ca-Gaben bei optimaler und suboptimaler Mg-Versorgung

Die Arbeiten von AKABORI et al. (1954), OIKAWA und MAEDA (1957) und OIKAWA (1959) wurden mir erst nach Abschluß der eigenen Untersuchungen bekannt. Wie bereits in der Einleitung kurz erwähnt wurde, stellte OIKAWA (l. c.) fest, daß 1 Molekül Amylase 1 Atom Ca in festgebundener, nicht dialysierbarer Form enthält. Die Entfernung des nicht dialysierbaren Ca mit EDTA hatte eine 97 prozentige Inaktivierung der Amylase zur Folge. Durch wiederholtes Umkristallisieren konnte das Ca ohne Aktivitätsverlust bis zu 40% durch Sr und bis zu 20% durch Mg ersetzt werden. Nach den Untersuchungen des genannten Autors ließ sich das Ca auch im Kulturversuch durch Sr ersetzen. OIKAWA (1959) züchtete *A. oryzae* auf einer Nährlösung mit Sr an Stelle des Ca. Die aus dem Kulturfiltrat gewonnene kristalline Amylase enthielt vorwiegend Ca, aber auch Sr. Die Amylase weist also eine größere Affinität zu Ca auf als zu Sr, da das Ca aus den Verunreinigungen der Nährlösung gegen einen Überschuß an Sr im betreffenden Enzym angereichert wurde. Aus der Arbeit von OIKAWA (l. c.) geht nicht hervor, ob die Amylaseausbeute im Kulturversuch geringer ausfällt, wenn die Nährlösung Sr statt Ca enthält.

Auf Grund der dargelegten Ergebnisse von OIKAWA mußte abgeklärt werden, ob die in Nährlösung B enthaltene Ca-Menge von 2  $\gamma$ /Liter für maximale Amylaseausbeute ausreicht. Zudem schien es notwendig, den Einfluß höherer Ca-Gaben bei gleichzeitigem Mg-Mangel zu untersuchen. Wie die eigenen Befunde gezeigt haben, fällt die spezifische dextrinogene Aktivität bei Mg-Mangel niedriger aus als bei optimaler Mg-Versorgung. Da das Ca in kristalliner Amylase ohne Aktivitätsverlust teilweise durch Mg ersetzt werden kann (OIKAWA), schien es möglich, daß sich im Kulturversuch eine

eventuelle ungenügende Ca-Konzentration bei gleichzeitig optimaler Mg-Versorgung nicht auf die Amylaseausbeute auswirkt, sondern daß erst bei Mg-Mangel relativ zum Myzelertrag weniger Amylase gebildet wird.

Mit gereinigter Nährlösung B wurden folgende Varianten angesetzt:

- a) 30 mg Mg, 40  $\gamma$  Ca/Liter
- b) 30 mg Mg, 400  $\gamma$  Ca/Liter
- c) 2 mg Mg, 400  $\gamma$  Ca/Liter
- d) 4 mg Mg, 400  $\gamma$  Ca/Liter

Die Ergebnisse dieses ergänzenden Versuches sind in Tab. 46 und 47 zusammengestellt.

Tab. 46. Einfluß höherer Ca-Gaben bei optimaler und suboptimaler Mg-Versorgung auf die Myzelausbeute in mg/25 ml Nährlösung. Durchschnitt aus zwei Parallelen

Kulturdauer Tage	MTG/25 ml der Varianten			
	a	b	c	d
5	115,7 $\pm$ 2,5	117,1 $\pm$ 3,5	41,3 $\pm$ 3,9	59,0 $\pm$ 8,0
6	125,9 $\pm$ 0,9	125,2 $\pm$ 4,8	52,0 $\pm$ 1,2	61,5 $\pm$ 9,5
8	126,9 $\pm$ 1,5	123,2 $\pm$ 3,2	67,5 $\pm$ 2,5	88,0 $\pm$ 2,4
10	119,2 $\pm$ 2,8	119,2 $\pm$ 4,2	73,6 $\pm$ 4,6	100,1 $\pm$ 3,7

Tab. 47. Einfluß höherer Ca-Gaben bei optimaler und suboptimaler Mg-Versorgung auf die absolute (cd) und spezifische (cd/MTG) dextrinogene Aktivität im Kulturfiltrat

Kulturdauer Tage	Variante							
	a		b		c		d	
	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG	cd	cd/MTG
5	666	5,8	666	5,7	100	2,4	154	2,6
6	666	5,3	706	5,6	111	2,1	154	2,5
8	706	5,6	706	5,7	125	1,8	210	2,4
10	750	6,3	706	5,9	148	2,0	222	2,2

### Besprechung der Ergebnisse

**Myzeltrockengewicht:** Aus dem Vergleich der Myzeltrockengewichte (MTG) von Tab. 46 mit denjenigen von Tab. 40 und 42 geht hervor, daß sich höhere Ca-Zusätze bei gleichzeitig optimaler Mg-Versorgung (Var. a und b) nicht auf den Myzelertrag auswirken. Bei den beiden Mg-Mangelvarianten (Var. c und d) kann hingegen ein Unterschied festgestellt werden. So beträgt die Myzelausbeute bei 2 mg Mg/Liter in den beiden Versuchen des vorherigen Abschnittes nach 6 tägiger Kulturdauer 90,5 mg bzw. 90,8 mg/Kolben, während mit gleicher Mg-Konzentration, aber 400  $\gamma$  Ca-Zusatz nur ein Myzelertrag von 52 mg erreicht wird. Mit 4 mg Mg/Liter Nährlösung B betrug die Myzelausbeute in den beiden Versuchen des vorherigen Abschnittes 106,4 und 106,9 mg pro Kolben nach 6 tägiger Kulturdauer; die entsprechende Myzelausbeute in Var. d hingegen beträgt nur 61,5 mg/Kolben. Die erwähnten Unterschiede im Myzelertrag bei Mg-Mangel mit 2  $\gamma$  respektive 400  $\gamma$  Ca/Liter sind auch nach 8- und 10 tägiger Kulturdauer noch deutlich zu erkennen. Die Ca-Konzentration von 400  $\gamma$ /Liter wirkt sich offensichtlich bei Mg-Mangel hemmend auf den Myzelertrag aus.

**Bildung dextrinogener Amylase:** Wie aus Tab. 47 hervorgeht, wird die Amylaseausbeute durch die zusätzliche Ca-Gabe von 40  $\gamma$  und 400  $\gamma$ /Liter zur vollständigen Nährlösung B (Var. a und b) nicht erhöht. Die dextrinogene Aktivität fällt im Gegenteil etwas tiefer aus als in den beiden Versuchen über den Einfluß des Mg in Nährlösung B mit 2  $\gamma$  Ca/Liter. Bei den beiden Mg-Mangelvarianten c und d ist die dextrinogene Aktivität geringer als bei entsprechendem Mg-Mangel in den früher beschriebenen Versuchen (Tab. 43). So beträgt die dextrinogene Aktivität in Var. c (2 mg Mg/Liter) nach 10 tägiger Kulturdauer 148 Einheiten, während bei entsprechendem Mg-Mangel mit 2  $\gamma$  Ca/Liter 300 Einheiten erreicht werden (Tab. 43). Variante d ergibt nach 10 tägiger Kulturdauer eine dextrinogene Aktivität von 222 Einheiten, der entsprechende cd-Wert beträgt hingegen 522. Die oben dargelegte Vermutung, daß die niedrige spezifische dextrinogene Aktivität bei Mg-Mangel auf einer ungenügenden Ca-Menge beruhen könnte, wurde also nicht bestätigt, sondern höhere Ca-Gaben wirkten im Gegenteil ungünstig auf die Amylasebildung.

Der ergänzende Versuch zeigt also:

1. Die in Nährlösung B enthaltene Ca-Menge von 2  $\gamma$ /Liter ermöglicht optimale Amylasebildung. [Es sei noch erwähnt, daß Ca-Verunreinigungen der Nährlösung durch die Extraktionsmethode nicht entfernt werden (Koch und Dedic 1957 b)].
2. Mg ist zur Amylasebildung notwendig und kann im Kulturversuch nicht durch Ca ersetzt werden.

**Proteolytische Aktivität:** Bei der Bestimmung der extrazellulären proteolytischen Aktivität nach der beschriebenen Methode ließen sich infolge Niederschlagsbildung beim Hinzufügen des Folin-Reagens' zum Filtrat keine reproduzierbaren kolorimetrischen Meßergebnisse erzielen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte deshalb durch Wägung des vor und nach der Reaktionszeit durch Trichloressigsäure noch fällbaren Caseins. Die Differenzen der Wägungen ergaben dabei für die 1 : 2 verdünnten Kulturfiltrate der Varianten a, b, c, d: 5,2 mg, 4,8 mg, 7,6 mg, 15,2 mg. Die proteolytische Aktivität ist also bei den Mg-Mangelvarianten (Var. c und d) wiederum höher als bei optimaler Mg-Versorgung (Var. a und b).

Bei diesem ergänzenden Versuch wurde auch die intrazelluläre proteolytische Aktivität im 10 tägigen Myzel ermittelt. Der Aufschluß des Myzels erfolgte dabei in gleicher Weise wie für die Bestimmung der intrazellulären Amylase mit dem Unterschied, daß Thymolwasser zur Elution benutzt wurde, wie das Gorbach und Koch (1955) zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität im Myzel von *A. niger* vorgeschlagen haben.

Das zerriebene Myzel eines Kolbens wurde in insgesamt 25 ml Thymolwasser aufgeschwemmt und über Nacht bei 0° C aufbewahrt. Der Fermentansatz mit dem zentri-fugierten Eluat wurde in gleicher Weise durchgeführt wie mit den Kulturfiltraten.

Für die Varianten a, b, c, d ergaben sich dabei folgende Extinktionswerte:  
0,02, 0,035, 0,150, 0,260.

Die intrazelluläre proteolytische Aktivität ist also bei Mg-Mangel (Var. c und d) ebenfalls höher als bei optimaler Mg-Versorgung (Var. a und b). Der Proteasegehalt der Myzelien, welche bei optimaler Mg-Konzentration gewachsen sind, ist praktisch gleich Null. Durch Vergleich mit der extrazellulären proteolytischen Aktivität der entsprechenden Mg-Mangelvarianten,

welche in Tab. 46 aufgeführt sind, beträgt der Proteasegehalt des Myzels ca. 25% desjenigen des Kulturfiltrates bei 2 mg Mg/Liter und ca. 10% bei 4 mg Mg/Liter.

8. Einfluß einiger Spurenelement-Mangel-Kombinationen auf die enzymatische Aktivität im Kulturfiltrat

Unter den üblichen Versuchsbedingungen wurden folgende Varianten angesetzt:

Variante	Spurenelementzusatz in $\gamma$ pro Liter Grundmedium						
	Fe	Mn	Zn	Ca	Mo	B	Cu
0	0	0	0	0	0	0	0
1	400	20	0	0	0	0	0
2	400	20	20	0	0	0	0
3	400	20	40	0	0	0	0
4	400	20	400	0	0	0	0
5	400	20	400	2	2	2	0
6	0	20	400	0	0	0	0
7	20	200	400	0	0	0	0
8	40	20	400	0	0	0	0
9	40	20	40	0	0	0	0
10	400	20	400	2	2	2	40

Die Ergebnisse betreffend Myzeltrockengewicht (MTG), dextrinogene Aktivität (cd), spezifische dextrinogene Aktivität (cd/MTG) und proteolytische Aktivität ( $\log I_0/I$ ) nach 7 tägiger Kulturdauer sind in Tab. 36 zusammengestellt.

Tab. 48. Einfluß einiger Spurenmangel-Kombinationen auf Myzelertrag (MTG) absolute (cd), spezifische (cd/MTG), dextrinogene und proteolytische Aktivität ( $\log I_0/I$ ) im Kulturfiltrat. Durchschnitt aus drei Parallelen

Variante	MTG	cd	cd/MTG	$\log I_0/I$
0	10,6	74	7,0	0,000
1	13,3	94	7,1	0,030
2	35,5 $\pm$ 2,1	200	5,7	0,000
3	53,6 $\pm$ 4,7	421	8,3	0,082
4	59,3 $\pm$ 2,2	572	9,7	0,615
5	72,7 $\pm$ 10,0	1034	14,2	0,710
6	42,3 $\pm$ 4,0	232	5,5	0,000
7	50,0 $\pm$ 7,1	320	6,4	0,000
8	51,2 $\pm$ 2,8	468	9,2	0,000
9	74,4 $\pm$ 16,4	482	6,8	0,005
10	141,0 $\pm$ 4,4	800	5,7	0,72

Besprechung der Ergebnisse

Aus Tab. 48 geht hervor, daß bei alleinigem Cu-Mangel die höchste Amylaseausbeute erreicht wird (Var. 5). Im kompletten Medium (Var. 10) sinkt die dextrinogene Aktivität gegenüber dem Cu-Nullwert um 200 Einheiten; die spezifische dextrinogene Aktivität fällt von 14,2 auf 5,7. Diese Befunde bestätigen also wiederum die hemmende Wirkung des Cu auf die Amylasebildung. Fehlen außer Cu noch die drei Elemente Ca, Mo und B (Var. 4), so fällt der Quotient cd/MTG trotz optimaler Versorgung mit Zn, Fe und Mn von 14,2 auf 9,7. Für die erhöhte Bildung amylolytischer Enzyme

bei Cu-Mangel sind demnach eines oder mehrere der Elemente Ca, Mo und B notwendig. Bei zusätzlichem abgestuftem Zn-Mangel (Var. 3, 2, 1) sinkt die spezifische dextrinogene Aktivität von 9,7 auf 8,3 bei 40  $\gamma$  Zn/Liter, auf 5,7 bei 20  $\gamma$  Zn/Liter und auf 7,1 in der Variante ohne Zinkzusatz. Bei zusätzlichem abgestuftem Fe-Mangel sinkt die spezifische dextrinogene Aktivität von 9,7 (Var. 4) bei optimaler Fe-Konzentration auf 9,2 bei 40  $\gamma$ , auf 6,4 bei 20  $\gamma$  Fe/Liter und auf 5,5 in der Variante ohne Fe-Zusatz. Daraus ergibt sich, daß für die erhöhte Bildung dextrinogener Amylase bei Cu-Mangel und gleichzeitiger Abwesenheit von Ca, Mo und B sowohl Zn als auch Fe nötig sind.

Wie sich schon in früheren Versuchen gezeigt hatte, ist die proteolytische Aktivität aller Kulturfiltrate, welche Zn- oder Fe-Mangel aufweisen, praktisch gleich Null. Vergleicht man die Varianten 3, 7, 8 und 9 beispielsweise mit der Variante 4, so sieht man, daß auch dann noch keine proteolytische Aktivität nachweisbar ist, wenn die vorhandenen Konzentrationen an Zn oder Fe für die mögliche Myzelbildung bei gleichzeitigem Cu-Mangel genügen würden. So ergab Var. 3 bei Cu-Mangel und genügender Fe- und Mn-Versorgung mit 40  $\gamma$  Zn/Liter eine durchschnittliche Myzelausbeute von 53,6 mg pro Kolben, jedoch praktisch keine proteolytische Aktivität im Kulturfiltrat, während in Var. 4 mit 400  $\gamma$  Zn/Liter und gleichen übrigen Spurenelementbedingungen die proteolytische Aktivität (ausgedrückt als Extinktionswert) von 0,08 auf 0,615 anstieg bei einer nur geringfügigen Erhöhung der Myzelausbeute auf 59,3 mg/Kolben. Der gleiche Effekt gilt für das Eisen noch ausgeprägter und geht aus dem Vergleich der Var. 8 und 4 hervor.

Aus der Gegenüberstellung der Var. 4 und 5 folgt, daß die drei Elemente Ca, Mo und B keinen spezifischen Einfluß auf die Bildung proteolytischer Enzyme ausüben; denn die Erhöhung der Aktivität bei Var. 5 entspricht lediglich der gleichzeitigen Erhöhung des Myzeltrockengewichts. Andererseits zeigt der Vergleich der Var. 5 und 10, daß bei Cu-Zusatz die proteolytische Aktivität praktisch unverändert bleibt, während die Myzelausbeute verdoppelt wird. Die relative proteolytische Aktivität ist also bei Cu-Mangel größer.

#### IV. Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Bildung dextrinogener Amylase

##### 1. Literatur

Nach MIHASHI und TATSUMI (1954) und SMIRNOV (1957) bildet *A. oryzae* auf einer modifizierten Czapek-Dox-Nährlösung mehr Amylase mit Stärke, Dextrin und Maltose als mit Glucose. Mit Xylose und Arabinose wurde wohl ein gutes Wachstum erzielt, jedoch keine Amylase gebildet. STÁRKA (1955) stellte in Nährlösungen mit 1–2% Stärke die höchsten Amylaseausbeuten fest. Höhere Konzentrationen wirkten hemmend auf die Amylasebildung. Nach FENIKSOVA (1957) ist die Amylaseausbeute mit Maltose, Dextrin und Stärke höher als mit Glucose, Saccharose, Arabinose, Xylose, Glycerin und Mannit. TIKHOMIROVA (1959) beobachtete abnehmende Amylasebildung in der Reihenfolge: Stärke, Maltose, Dextrin, Glucose. MEYRATH (1957 b) stellte fest, daß die Amylaseausbeute bei gleicher C-Quelle je nach Herkunft des verwendeten Präparats (Merck, BDH) verschieden ausfiel. Die Bildung dextrinogener Amylase war im Durchschnitt mit Maltose, Dextrin und Stärke gleich groß, jedoch durchweg höher als mit Glucose. Wie bereits erwähnt, vermutete MEYRATH, daß die unterschiedliche Amylaseausbeute bei C-Quellen verschiedener Herkunft auf Spurenelementeinflüssen beruhen könnte.

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Amylasebildung durch Spurenelemente beeinflusst werden kann, schien es angebracht, die Amylaseausbeute

bei verschiedenen C-Quellen unter definierten Spurenelementbedingungen zu überprüfen. Der Einfluß von Zn-, Fe- und Cu-Mangel wurde dabei ebenfalls berücksichtigt.

## 2. Experimentelles

In den Vergleich wurden einbezogen: Glucose (Merck), Maltose (Hoffmann-La Roche, Basel), Dextrin (150/160, Blattmann, Wädenswil) und lösliche Stärke (Analar, BDH). Diese C-Quellen werden 1 proz. einem Grundmedium folgender Zusammensetzung beigefügt: 15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . pH = 6,0 mit 5 n HCl.

Es zeigte sich, daß eine Reinigung des Stärkemediums nach der beschriebenen Extraktionsmethode nicht möglich war, da sich beim Schütteln starke Emulsionen bildeten. Eine geringe Schaumbildung trat wohl auch beim dextrinhaltigen Medium auf, doch konnte durch längeres Stehenlassen eine befriedigende Phasentrennung erzielt werden.

Die Stärke wurde deshalb als 2 proz. Lösung durch Autoklavieren mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  separat gereinigt, der anorganische Anteil der Nährlösung hingegen bei pH 6,0 mit Oxin und Dithizon in Chloroform extrahiert.

## 3. Ergebnisse

### a) Ergebnisse des 1. Versuches

Tab. 49. Einfluß verschiedener C-Quellen auf cd, MTG (in mg/25 ml Nährlösung) und cd/MTG. Durchschnitt aus zwei Parallelen

Tag		Glucose	Maltose	Dextrin	Stärke
3	cd	100	270	250	—
	MTG	56,0 ± 1,6	50,1 ± 3,7	21,4 ± 2,6	—
	cd/MTG	1,8	5,4	11,9	—
4	cd	160	400	546	—
	MTG	87,6 ± 2,4	86,2 ± 2,8	40,0 ± 1,2	—
	cd/MTG	1,8	4,7	13,6	—
5	cd	187	462	632	255
	MTG	96,6 ± 4,8	92,0 ± 0,6	45,0 ± 0,2	39,3 ± 0,5
	cd/MTG	1,9	5,0	14,0	6,5
6	cd	197	462	706	279
	MTG	97,0 ± 1,0	98,4 ± 2,0	52,0 ± 0,4	64,2 ± 3,8
	cd/MTG	2,0	4,7	13,6	4,3
8	cd	197	462	750	210
	MTG	94,6 ± 0,6	105,7 ± 0,3	51,8 ± 3,4	95,2 ± 0,4
	cd/MTG	2,1	4,4	14,5	2,2
10	cd	—	—	—	232
	MTG	—	—	—	95,2 ± 4,4
	cd/MTG	—	—	—	2,4
12	cd	191	400	666	210
	MTG	88,8 ± 3,4	92,9 ± 5,5	58,3 ± 2,1	89,9 ± 0,1
	cd/MTG	2,2	4,4	11,4	2,3

Die Nullvarianten für Zn, Fe und Cu wurden nach 8 tägiger Kulturdauer gerntet. Die Ergebnisse sind in Tab. 50 zusammengestellt.

Tab. 50. Einfluß von Zn-, Fe- und Cu-Mangel auf cd, MTG (in mg/25 ml Nährlösung) und cd/MTG bei verschiedenen C-Quellen. Durchschnitt aus zwei Parallelen

Nullvariante		Glucose	Maltose	Dextrin	Stärke
Zn	cd	31	71	45	113
	MTG	9,5 ± 0,7	10,5 ± 0,6	9,0 ± 1,0	8,8 ± 0,2
	cd/MTG	3,3	6,8	5,0	7,8
Fe	cd	108	215	125	114
	MTG	30,2 ± 1,8	55,3 ± 5,7	25,1 ± 0,3	16,9 ± 0,5
	cd/MTG	3,6	3,9	5,0	6,7
Cu	cd	214	571	750	333
	MTG	43,7 ± 7,1	43,4 ± 0,8	37,1 ± 4,9	90,1 ± 0,7
	cd/MTG	4,9	13,2	20,2	3,7

b) Ergebnisse des 2. Versuches. Es wurde nicht nur die Stärke, sondern auch das Dextrin separat durch Autoklavieren mit  $Al_2O_3$  gereinigt, um einen eventuellen nachteiligen Einfluß dieser Reinigungsart auf die Enzymbildung abzuklären (vgl. Tab. 51). Zudem wurden die Zn-, Fe- und Cu-Nullvarianten während der ganzen Kulturdauer verfolgt (vgl. Tab. 52). Glucose und Maltose wurden wie im 1. Versuch nach der Extraktionsmethode gereinigt.

Tab. 51. Einfluß verschiedener C-Quellen auf cd, MTG (mg/25 ml Nährlösung) und cd/MTG. Durchschnitt aus zwei Parallelen

Tage		Glucose	Maltose	Dextrin	Stärke
3	cd	—	—	—	—
	MTG	40,9 ± 6,5	42,4 ± 1,0	—	—
	cd/MTG	—	—	—	—
4	cd	143	342	—	—
	MTG	108,4 ± 4,4	80,1 ± 3,3	41,1 ± 4,1	34,4 ± 2,6
	cd/MTG	1,4	4,3	—	—
5	cd	167	400	375	273
	MTG	114,1 ± 0,3	122,1 ± 3,9	53,0 ± 0,0	82,4 ± 6,4
	cd/MTG	1,5	3,3	7,1	3,3
6	cd	182	400	460	300
	MTG	106,8 ± 3,4	132,0 ± 0,6	61,4 ± 0,6	111,4 ± 1,4
	cd/MTG	1,7	3,0	7,5	2,7
7	cd	—	—	460	333
	MTG	—	—	65,7 ± 0,1	150,5 ± 1,5
	cd/MTG	—	—	7,0	2,2
8	cd	193	428	460	324
	MTG	150,5 ± 7,5	142,7 ± 9,3	85,9 ± 0,4	129,1 ± 1,1
	cd/MTG	1,3	3,0	5,4	2,2



Tab. 52. Einfluß von Zn-, Fe- und Cu-Mangel auf cd, MTG (mg/25 ml Nährlösung) und cd/MTG bei verschiedenen C-Quellen. Durchschnitt aus zwei Parallelen

Tage	Nullvariante		Glucose	Maltose	Dextrin	Stärke
5	Zn	cd	17	35	40	109
		MTG	7,6	6,7	9,7	20,6
		cd/MTG	2,2	5,2	4,1	5,4
	Fe	cd	50	100	42	64
		MTG	16,3	30,1	7,8	10,2
		cd/MTG	3,2	3,3	5,4	6,3
	Cu	cd	172	444	364	273
		MTG	47,8 ± 0,8	46,5 ± 1,1	45,8 ± 7,8	56,0 ± 1,8
		cd/MTG	3,6	9,5	8,1	4,9
6	Zn	cd	29	46	43	154
		MTG	10,5	8,5	8,6	26,3
		cd/MTG	2,8	5,4	5,3	5,8
	Fe	cd	64	107	71	83
		MTG	27,4	30,7	16,8	14,3
		cd/MTG	2,3	3,5	4,2	5,9
	Cu	cd	214	522	444	300
		MTG	46,0 ± 1,0	46,8 ± 6,8	47,4 ± 2,2	89,0 ± 10,0
		cd/MTG	4,6	11,1	9,3	3,4
8	Zn	cd	83	72	48	207
		MTG	25,2	10,5	10,6	31,2
		cd/MTG	3,3	6,3	4,5	6,7
	Fe	cd	59	216	128	133
		MTG	30,8	55,3	26,6	22,7
		cd/MTG	1,9	3,9	4,8	5,9
	Cu	cd	207	572	546	400
		MTG	94,5 ± 24,1	43,3 ± 0,8	65,5 ± 3,9	107,5 ± 4,9
		cd/MTG	2,2	13,3	8,3	4,0

c) Ergebnisse des 3. Versuches. Nachdem sich im 2. Versuch gezeigt hatte, daß die Reinigungsmethode einen Einfluß auf die Amylaseausbeute ausübt, wurden in einem weiteren Ansatz ungereinigte und gereinigte Medien mit Maltose und Dextrin verglichen. Zudem hatten Untersuchungen über den Einfluß steigender N-Zusätze ergeben, daß mit 15 g Maltose pro Liter Grundmedium mit 0,2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mehr Amylase gebildet wird als mit den bisher zugesetzten 0,15% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Da die Myzelausbeuten mit Dextrin wesentlich tiefer ausfallen als mit Maltose (bei gleicher Konzentration), wurde vermutet, daß die N-Konzentration der zwei ersten Versuche für die Amylasebildung auf Dextrin, nicht aber für die potentiell höhere Produktion auf Maltose ausreichte. Aus diesem Grund wurde die N-Konzentration erhöht.

## Versuchsanordnung:

	ungereinigtes Medium	gereinigtes Medium
	g	g
Maltose oder Dextrin . . .	15	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O . . . . .	20	13,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	20	13,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	2	1,5
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,3	0,3
	ad 1 Liter mit dest. Wasser Spurenelementzusatz wie bei Nährlösung B	ad 1 Liter mit dest. Wasser Spurenelementzusatz wie bei Nährlösung B

Die geringere Konzentration der C-Quelle im gereinigten Medium wurde gewählt, um eine befriedigende Phasentrennung beim Extrahieren des Dextrinmediums zu erreichen.

Tab. 53. Einfluß von Maltose und Dextrin auf cd, MTG (mg/25 ml Nährlösung) und cd/MTG, bei ungereinigter und gereinigter Nährlösung. Durchschnitt aus vier Parallelen

Tage		ungereinigt		gereinigt	
		Maltose	Dextrin	Maltose	Dextrin
6	cd	1150	812	858	954
	MTG	104,4 ± 2,7	85,8 ± 2,8	105,8 ± 1,8	100,5 ± 0,8
	cd/MTG	11,0	9,5	8,1	9,5
8	cd	1176	960	858	1008
	MTG	110,8 ± 3,8	82,1 ± 5,4	104,2 ± 1,2	88,3 ± 3,8
	cd/MTG	10,7	11,7	8,2	10,0

Tab. 54. Einfluß von Zn-, Fe- und Cu-Mangel auf cd, MTG (mg/25 ml Nährlösung) und cd/MTG bei Maltose und Dextrin. Durchschnitt aus vier Parallelen

Tage	Nullvariante	Maltose			Dextrin		
		cd	MTG	cd/MTG	cd	MTG	cd/MTG
6	Zn	102	12,5 ± 1,5	8,1	42	9,3 ± 2,8	4,5
	Fe	100	20,2 ± 2,2	5,0	97	19,0 ± 3,4	5,1
	Cu	924	46,8 ± 1,8	19,2	430	45,2 ± 1,9	9,6
8	Zn	129	17,5 ± 2,1	7,4	59	10,5 ± 1,1	5,6
	Fe	138	35,3 ± 2,1	4,0	109	25,1 ± 3,7	5,7
	Cu	1000	46,2 ± 0,2	21,6	685	40,8 ± 2,6	16,6

#### 4. Besprechung der Ergebnisse

a) 1. Versuch: Tab. 50 zeigt, daß die relativen Nullwerte für Zn, Fe, Cu und damit die entsprechenden Spurenelementgehalte der gereinigten Medien nur unwesentlich voneinander abweichen. Abgesehen von der verschiedenen Reinigungsmethode (Stärke mit Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> autoklaviert, übrige Medien extrahiert) ist also nach Zusatz der angegebenen Spurenelementmengen der alleinige Einfluß der C-Quellen gewährleistet.

Die Myzelausbeuten (Tab. 49) erreichen mit Glucose, Maltose und Stärke annähernd den gleichen Wert, wobei jedoch die Induktionsphase

im Stärkemedium bedeutend verlängert ist. Mit Dextrin hingegen beträgt der Myzelertrag nur ca. 60% desjenigen der übrigen C-Quellen.

Die dextrinogene Aktivität erreicht bei allen C-Quellen nach 6—8 tägiger Kulturdauer ein Maximum und sinkt bis zum 12. Tage wieder etwas ab.

Nach 8 tägiger Kulturdauer ist die dextrinogene Aktivität (cd) mit Dextrin (750) am höchsten, gefolgt von Maltose (462), Stärke (210) und Glucose (197). Die spezifische dextrinogene Aktivität (cd/MTG) beträgt in gleicher Reihenfolge: 14,5, 4,4, 2,2 und 2,1. Im Verhältnis zum Myzelertrag wird also mit Dextrin rund dreimal mehr Amylase gebildet als mit Maltose und sechsmal mehr als mit Stärke und Glucose. Verfolgt man die spezifische dextrinogene Aktivität der verschiedenen C-Quellen im Verlauf der Kulturdauer, so zeigt sich, daß mit Glucose, Maltose und Dextrin nur geringe Schwankungen auftreten; im Stärkemedium hingegen sinkt cd/MTG von 6,5 auf 2,2. Dieser Unterschied ergibt sich, weil mit Stärke schon während der Induktionsphase maximale dextrinogene Aktivität erreicht wird. So beträgt der Myzelertrag nach 5 tägiger Kulturdauer 39,3 mg/Kolben und die dextrinogene Aktivität 255 Einheiten; nach 10 tägiger Kulturdauer wird eine Myzelausbeute von 95,2 mg erreicht, während die dextrinogene Aktivität mit 232 Einheiten sogar etwas gesunken ist.

Tab. 50 läßt erkennen, daß sich Zn-, Fe- und Cu-Mangel bei den verschiedenen C-Quellen unterschiedlich auf die spezifische dextrinogene Aktivität auswirken. Bei Zn-Mangel wird im Verhältnis zum Myzelertrag mit Glucose, Maltose und Stärke mehr Amylase gebildet als in den entsprechenden kompletten Medien. Der Effekt ist im Stärkemedium am ausgeprägtesten. Im Dextrinmedium hingegen sinkt die spezifische Aktivität von 14,5 bei optimaler Zn-Versorgung (Tab. 49) auf 5,0 bei Zn-Mangel (Tab. 50).

Bei Fe-Mangel fällt die spezifische Aktivität im Glucose- und Stärkemedium höher aus als bei optimaler Fe-Versorgung, während im Maltose- und Dextrinmedium gerade der umgekehrte Effekt eintritt.

b) 2. Versuch: Tab. 51 zeigt, daß, wie im 1. Versuch, mit Glucose, Maltose und Stärke wiederum eine höhere Myzelausbeute erreicht wird als mit Dextrin. Die dextrinogene Aktivität ist nach 8 tägiger Kulturdauer wiederum am höchsten mit Dextrin (460) gefolgt von Maltose (428), Stärke (324) und Glucose (193). Für cd/MTG ergibt sich ebenfalls die gleiche Reihenfolge wie im 1. Versuch: Dextrin (5,4), Maltose (3,0), Stärke (2,2), Glucose (1,3). Der cd-Wert des Dextrinmediums ist im Vergleich zu demjenigen des 1. Versuches von 750 auf 460 gesunken. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß sich die Reinigung der C-Quelle mit  $Al_2O_3$  schlecht auf die Amylasebildung auswirkt. Erhöht man die Aktivität des Stärkemediums rechnerisch um den gleichen prozentualen Betrag, um den die Aktivität des Dextrinmediums durch die Behandlung mit  $Al_2O_3$  verringert wird, so ergibt sich für das Stärke- und Maltosemedium annähernd die gleiche Aktivität. Mit Dextrin wird jedoch auch bei gleicher Reinigungsmethode ( $Al_2O_3$ ) eine höhere Amylaseausbeute erzielt, als mit Stärke.

Aus Tab. 52 geht hervor, daß sich Zn-, Fe- und Cu-Mangel bei den verschiedenen C-Quellen in gleicher Weise auf die spezifischen dextrinogenen Aktivitäten auswirken wie im 1. Versuch. Im Vergleich mit vollständigem Medium ergibt: Zn-Mangel höhere spezifische Aktivität bei Glucose, Maltose und Stärke, geringere spezifische Aktivität bei Dextrin. Fe-Mangel höhere spezifische Aktivität bei Glucose und Dextrin, gleiche spezifische

Aktivität mit Maltose, geringere spezifische Aktivität mit Dextrin. Cu-Mangel höhere spezifische Aktivität bei allen C-Quellen, am ausgeprägtesten bei Maltose.

Ein weiterer Versuch mit Dextrin bestätigte, daß die Amylaseausbeute höher ausfällt, wenn die Nährlösung durch Extraktion gereinigt wird, als durch Autoklavieren mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Die dextrinogene Aktivität betrug nach 8 tägiger Kulturdauer 924 Einheiten und übertraf somit den im 1. Versuch erhaltenen Wert (750) noch beträchtlich. Auch im Einfluß von Zn-, Fe und Cu-Mangel auf die spezifische dextrinogene Aktivität stimmten die Ergebnisse mit dem 1. Versuch überein. So betrug cd/MTG im vollständigen Medium 18,4, bei Zn-Mangel 5,3, bei Fe-Mangel 3,6, bei Cu-Mangel 22,4.

c) 3. Versuch: Tab. 53 läßt erkennen, daß die höhere N-Konzentration die Amylasebildung fördert. Im Vergleich zum 1. Versuch ist die dextrinogene Aktivität im gereinigten Maltosemedium um rund 400, im Dextrinmedium um 250 Einheiten höher. Selbst bei für Amylaseausbeute optimaler N-Konzentration ist jedoch die dextrinogene Aktivität nach 8 tägiger Kulturdauer im gereinigten Dextrinmedium um 150 Einheiten oder 17% höher als im Maltosemedium. Mit ungereinigten Nährlösungen hingegen ergibt Maltose eine höhere Amylaseausbeute als Dextrin. Der Unterschied beträgt nach 8 tägiger Kulturdauer rund 200 Einheiten oder 18%. Es ist ferner auffallend, daß auf dem ungereinigten Maltosemedium mehr dextrinogene Amylase gebildet wird als auf dem gereinigten. Möglicherweise beruht der Unterschied lediglich auf den höheren Maltose- und  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Konzentrationen; es wäre aber auch denkbar, daß beim Extrahieren des Maltosemediums eine Substanz entfernt wird, welche die Amylasebildung stimuliert. Im ungereinigten Dextrinmedium wird trotz höherer C- und N-Konzentration weniger Amylase gebildet als im gereinigten. Beim Extrahieren des Dextrinmediums wird vielleicht eine Substanz entfernt, welche die Amylasebildung hemmt.

Es fragt sich, ob die besprochenen Effekte auf Spurenelementeinflüssen beruhen. Da ja den ungereinigten Medien die gleichen Spuren Mengen zugesetzt wurden wie den gereinigten Nährlösungen, kann es sich nicht um Wirkungen der Elemente handeln, die im III. Teil dieser Arbeit untersucht wurden. Denkbar wäre, daß neben den untersuchten noch andere Spurenelemente die Amylasebildung beeinflussen. Es scheint aber auch nicht ausgeschlossen, daß organische Substanzen eine Rolle spielen. So geht aus der Arbeit von FENIKSOVA (1957) hervor, daß durch geringe Malzextraktzusätze zu einer synthetischen Nährlösung die Amylaseausbeute von *A. oryzae* verdoppelt werden kann. DUNN et al. (1959) haben festgestellt, daß Ca-Phytat oder Phytinsäure die Amylasebildung von *A. niger* und *A. oryzae* in ausgeprägtem Maße stimuliert. Die Phytinsäure ließ sich in ihrer Wirkung weder durch Inosit und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  noch durch Hefeextrakt, Pepton und verschiedene Vitamine ersetzen.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse kann nicht entschieden werden, ob derartige organische Substanzen eine Rolle spielen. Hingegen zeigt der 3. Versuch wiederum (Tab. 54), daß sich Zinkmangel unterschiedlich auf die spezifische dextrinogene Aktivität auswirkt, je nachdem ob Maltose oder Dextrin als C-Quelle verwendet wird. Mit Maltose als C-Quelle ergibt sich bei Zn-Mangel die gleiche spezifische dextrinogene Aktivität wie bei optimaler Zn-Versorgung. Mit Dextrin dagegen beträgt

die spezifische Aktivität bei Zn-Mangel nur die Hälfte derjenigen des kompletten Mediums. Cu-Mangel bewirkt bei allen C-Quellen eine Erhöhung der spezifischen Aktivität. Der Effekt ist im Maltosemedium am ausgeprägtesten. So beträgt  $cd/MTG$  im kompletten Medium 4,4, bei Cu-Mangel 13,2.

## V. Diskussion

Bei den beobachteten Spurenelementeinflüssen auf die Enzymbildung von *A. oryzae* wurde jeweils geprüft, ob eventuell eine bloße Aktivierung oder Hemmung der enzymatischen Reaktion vorliege. So wurde beispielsweise die dextrinogene Aktivität eines Cu-Mangelkulturfiltrates mit und ohne Cu-Zusatz ermittelt; die proteolytische Aktivität eines Mg-Mangelkulturfiltrates wurde mit und ohne Mg-Zusatz bestimmt usw. In keinem Fall konnte jedoch durch Spurenelementzusatz eine Änderung der dextrinogenen oder proteolytischen Aktivität festgestellt werden. Die beobachteten Spurenelementeinflüsse beziehen sich somit direkt auf die Enzymbildung und beruhen nicht auf einer Hemmung oder Aktivierung der enzymatischen Reaktion.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist die Bildung amylytischer und proteolytischer Enzyme z. T. in gleicher, z. T. jedoch gerade in entgegengesetzter Weise von den einzelnen Elementen abhängig. Es ist vorläufig nicht möglich, die spezifischen Wirkungen einzelner Spurenelemente auf die Enzymbildung zu erklären, da die Proteinsynthese selbst ja noch ein weitgehend ungelöstes Problem darstellt (vgl. z. B. SIMKIN 1959). Außer der bereits erwähnten aktivierenden Rolle des Mg bei den Beladungsreaktionen der Aminosäuren finden sich in der Literatur auch keine Angaben über spezifische Funktionen von Spurenelementen innerhalb der Proteinsynthese. Gerade das Beispiel des Mg zeigt indessen, daß allzu direkte Erklärungsversuche versagen, da ja bei Mg-Mangel nicht nur relativ zum Myzelertrag, sondern auch absolut mehr Proteasen gebildet wurden als bei für das Wachstum optimaler Mg-Versorgung. Verallgemeinerungen von Einzelergebnissen sind auf diesem Gebiet wohl sicher noch verfrüht.

Dennoch sei kurz auf einige Literaturangaben hingewiesen, die möglicherweise mit der hier beobachteten eigenartigen Steigerung der Amylase- und Proteasebildung durch Cu-Mangel in Zusammenhang stehen.

Es scheint, daß Cu die Bildung von Atmungsenzymen begünstigt. Nach UNDRITZ (1957) wird zur Synthese von Haem, der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins, Cu benötigt. Gleiches gilt nach SCHULTZE und KUIKEN (1941) für die prosthetische Gruppe des Häminferments Katalase. Man darf annehmen, daß Cu auch bei der Synthese des Häminanteils der Cytochrome, dieser wichtigen Atmungsfermente, mitwirkt. In diesem Zusammenhang sei der Befund von NICHOLAS (1957 e) erwähnt, daß die hemmende Wirkung von Mo auf die Bildung von Cytochromoxydase und Cytochrom c-Reduktase bei *Neurospora crassa* durch Cu-Zusatz teilweise aufgehoben werden kann. Daneben sollen Cu-Proteide wie die Phenoloxidasen für die Atmung, wenigstens bei höheren Pflanzen, eine Rolle spielen (vgl. BALDWIN 1957).

Ein gewisser Antagonismus von Atmung einerseits und Amylasebildung andererseits wird nun aber durch Beobachtungen von SHU (1953) angedeutet. Er stellte fest, daß bei *Aspergillus niger* die  $O_2$ -Aufnahme für maximales

Wachstum um 150% höher liegt als die  $O_2$ -Aufnahme für maximale Amylaseausbeute. Es wäre also denkbar, daß bei Cu-Mangel deshalb mehr Amylasen und Proteasen gebildet werden, weil primär die Synthese prothetischer Gruppen von Atmungsfermenten gehemmt ist.

## VI. Zusammenfassung

Der Einfluß von Zn, Fe, Cu, Mn und Mg auf das Wachstum von *Aspergillus oryzae* und die Bildung amylytischer und proteolytischer Enzyme wurde untersucht. Ferner wurden Versuche über den Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Bildung dextrinogener Amylase unter definierten Spurenelementbedingungen durchgeführt. Hierzu waren ausgedehnte Vorversuche über die Arbeitstechnik bei Spurenelementversuchen sowie über Zusammensetzung und Pufferung von Nährlösungen für optimale Amylasebildung erforderlich. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

### a) Einfluß von Spurenelementen auf Wachstum und Enzyymbildung.

1. Für das Wachstum auf einer gereinigten Nährlösung mit 15 g Maltose, 40 g Phosphat und 1,5 g  $(NH_4)_2HPO_4$  pro Liter (Nährlösung B) erwiesen sich folgende Spurenelementzusätze als optimal: 200  $\gamma$  — 1 mg Zn, 200  $\gamma$  — 10 mg Fe, 40  $\gamma$  — 200  $\gamma$  Cu und 15—100 mg Mg. Reduzierte Konidienbildung zeigt schwachen, reduzierter Myzelertrag stärkeren Spurenelementmangel an. Überoptimale Spurenelementkonzentrationen können die gleichen Effekte in geringerem Maße hervorrufen.
2. Der zeitliche Wachstumsverlauf bei Cu-Mangel unterscheidet sich wesentlich von demjenigen bei Zn-, Fe- und Mg-Mangel. Bei Cu-Mangel wird, wie in einem kompletten Medium, nach ca. 5 tägiger Kulturdauer ein maximaler Myzelertrag erreicht, worauf anschließend Autolyse einsetzt. Bei Mangel eines der übrigen Elemente hingegen nimmt der Myzelertrag selbst nach 10 tägiger Kulturdauer noch weiter zu.
3. Die Bildung dextrinogener Amylase ist in folgender Weise von den untersuchten Elementen abhängig:

Zn: 60  $\gamma$  — 200  $\gamma$  Zn/Liter ergaben maximale Amylaseausbeuten. Höhere Konzentrationen wirkten hemmend. Die spezifische dextrinogene Aktivität nimmt mit steigender Zn-Konzentration ab.

Fe: Mit steigender Fe-Konzentration wird vermehrt Amylase gebildet. Höchste Amylaseausbeute wurde bei wachstumshemmenden Fe-Konzentrationen von 10—100 mg/Liter erreicht.

Cu: Bei Cu-Mangel wird nicht nur relativ zum Myzelertrag, sondern auch absolut mehr dextrinogene Amylase gebildet als bei wachstumsoptimaler Cu-Konzentration.

Mn: Im Konzentrationsbereich von 0—20 mg Mn/Liter war kein Einfluß zu bemerken. 40 mg Mn/Liter wirkten hemmend.

Mg: Die höchste Amylaseausbeute ergaben Konzentrationen von 30—100 mg Mg/Liter. Bei für das Wachstum suboptimalen Mg-Konzentrationen wird im Verhältnis zum Myzelertrag weniger Amylase gebildet. Ca-Zusatz bei Mg-Mangel verstärkt die Hemmung der Amylasebildung.

4. Zur Bildung proteolytischer Enzyme sind Zn und Fe unbedingt erforderlich. Die Kulturfiltrate zeigen erst dann eine nennenswerte proteolytische Aktivität, wenn die vorhandenen Zn- und Fe-Konzentrationen für maximale Myzelbildung ausreichen.

Im Vergleich zur optimalen Spurenelementversorgung werden besonders bei Mg-Mangel, etwas weniger ausgeprägt auch bei Cu-Mangel und Fe-Überschuß vermehrt proteolytische Enzyme gebildet.

b) Einfluß verschiedener C-Quellen auf die Bildung dextrinogener Amylase

1. In gereinigter Nährlösung B wird mit Dextrin als C-Quelle sowohl absolut wie auch relativ zum Myzelertrag mehr dextrinogene Amylase gebildet als mit Maltose, Stärke und Glucose. Maltose und Stärke ergaben etwa gleiche Amylaseausbeute, Glucose erwies sich für die Amylasebildung als schlechteste C-Quelle.
2. In ungereinigter, mit Spurenelementzusätzen versehener Nährlösung B hingegen wurde auf Maltose mehr dextrinogene Amylase gebildet als auf Dextrin.
3. Im Vergleich zur spezifischen dextrinogenen Aktivität der entsprechenden kompletten Medien ergab Cu-Mangel bei allen C-Quellen höhere; Fe-Mangel bei Glucose und Stärke höhere, bei Dextrin und Maltose dagegen tiefere; Zn-Mangel bei Glucose, Maltose und Stärke höhere, bei Dextrin dagegen geringere spezifische dextrinogene Aktivität.

c) Einfluß von pH und N-Quelle auf die Bildung dextrinogener Amylase

1. Die Amylasebildung ist im benutzten Medium bei pH 5,5 am höchsten, nimmt bis pH 7,0 ab und steigt bis pH 8,0 wieder leicht an. Unterhalb pH 5,5 ist die dextrinogene Amylase bei der Kultivierungstemperatur von 25° C unstabil.
2. Mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  wurden höhere Amylaseausbeuten erzielt als mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Pepton, Harnstoff und Glutaminsäure, wenn der Zusatz der einzelnen N-Quellen so bemessen wurde, daß die N-Konzentration derjenigen von 2,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pro Liter Nährlösung entsprach.

d) Arbeitstechnik bei Spurenelementversuchen

1. Mit der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Methode nach DONALD et al. (1952) ließen sich die von ihr erreichten Nullwerte für Zn und Fe ohne weiteres reproduzieren, nicht aber diejenigen für Cu und Mn. Durch verschiedene Modifikationen gelang es, die Cu- und Mn-Nullwerte etwas weiter zu senken.
2. Zur Reinigung des für die enzymatischen Untersuchungen entwickelten, stark gepufferten Mediums (Nährlösung B) erwies sich die Extraktion mit Dithizon und Oxin geeigneter als die  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Methode.

### Schrifttum

AKABORI, S., IKENAKA, T., HANAFUSA, H., und OKADA, J., J. Biochem. 41, 537 (1954). — ANSON, M. L., J. Gen. Physiol. 22, 79 (1938). — BALDWIN, E., Biochemie. Weinheim 1957. — BAMANN, E., und MYRBÄCK, K., Methoden der Fermentforschung. Leipzig 1941. — BERTRAND, D., et DE WOLF, A., Compt. rend. 245, 1179 (1957). —

Dies., *Compt. rend.* **246**, 2415—2537 (1958 a). — Dies., *Compt. rend.* **247**, 888 (1958 b). — COCHRANE, V. W., *Physiology of Fungi*. New York u. London 1958. — COLOWICK, S. P., and KAPLAN, N. O., *Methods in Enzymology*. New York 1957. — DIXON, M., und WEBB, E. C., *Enzymes*. London 1958. — DONALD, C., PASSEY, B. I., and SWABY, R. J., *J. Gen. Microbiol.* **7**, 211 (1952.) — DOZER, J., *Science* **115**, 93 (1952). — DUNN, C. G., FULD, G. J., YAMADA, K., URIOSTE, J. M., and CASEY, P. R., *Appl. Microbiol.* **7**, 212 (1959). — DWORSCHACK, R. G., KOEPSSELL, H. J., und LAGODA, A. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **41**, 48 (1952). — ELVEHJEM, C. A., *J. Biol. Chem.* **90**, 111 (1931). — FENIKSOVA, R. V., *Symp. Proc. Int. Enz. Chem.* New York (1957). — FISCHER, J., *Planta* **32**, 395 (1941/42). — FOSTER, J. W., *Bot. Rev.* **5**, 207 (1939). — Ders., *Chemical Activities of Fungi*. New York 1949. — GALLMICK, F., *Zbl. Bakter. II* **93**, 421 (1936). — GILLESPIE, D. M., JERMYN, J. M., and WOODS, E. F., *Nature* **169**, 487 (1952). — GORBACH, G., und KOCH, O. G., *Arch. Mikrobiol.* **23**, 265 (1955). — GORBACH, G., KOCH, O. G., und BROMANDER, A., *Zbl. Bakter. II*, **109**, 1 (1956). — GORBACH, G., TERRANOVA, T., und TERRANOVA, J., *Arch. Mikrobiol.* **26**, 1 (1957). — HOFFMANN, E. J., SCHECK, H., und SAFFERT, K., *Biochem. Z.* **320**, 126 (1950). — HUGO, W. B., *Bact. Rev.* **18**, 87 (1954). — IWANTSCHOFF, G., *Das Dithizon*. Weinheim 1958. — JAVILLIER, M., *C. R. Acad. Sci. Paris* **158**, 140 (1914). — KIUCHI, M., *C. A.* **48**, 10 833 (1954). — KOCH, O. G., und DÉDIC, D. A., *Zbl. Bakter. II* **110**, 178 (1957 a). — Dies., *Zbl. Bakter. II* **110**, 490 (1957 b). — LAMB, C. A., BENTLEY, O. G., and BEATTIE, J. M., *Trace Elements*. New York a. London 1958. — LEHNINGER, A. L., *Physiol. Rev.* **30**, 393 (1950). — MAHLER, H. R., *Advanc. Enzymol.* **21**, 131 (1956). — MANDELS, M., und REESE, E. T., *J. Bacteriol.* **73**, 269 (1957). — MAXWELL, M. E., *Austral. J. Appl. Sci.* **1**, 348 (1950). — Ders., *Austral. J. Sci. Res., Ser. B* **5**, 42 (1952). — McELROY, W. D., and NASON, A., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **5**, 1 (1954). — McHARGUE, J. S., and CALFEE, R. K., *Botan. Gaz.* **91**, 183 (1931). — McLEOD, R. A., and SNELL, E. E., *J. Bact.* **59**, 783 (1950). — MEDINA, A., and NICHOLAS, D. J. D., *Nature* **179**, 87 (1957 a). — Dies., *Biochem. J.* **66**, 573 (1957 b). — MEYRATH J., *Diss. ETH*, 1957 a. — Ders., 1957 b. 1959 (persönl. Mitteilung unpubl.). MIHASHI, Y., und TATSUMI, M., *C. A.* **48**, 12 892 (1954). — MULDER, E. G., *Arch. Mikrobiol.* **10**, 72 (1939). — NAKANISHI, K., *J. Biochem.* **46**, 1411 (1959). — NICHOLAS, D. J. D., *J. Sci. Food Agr.* **1**, 339 (1950). — Ders., *Analyst* **77**, 629 (1952). — NICHOLAS, D. J. D., und NASON, A. H., *J. Biol. Chem.* **211**, 183 (1954). — NICHOLAS, D. J. D., *Nature* **180**, 555 (1957 a). — Ders., *J. Gen. Microbiol.* **17**, 689 (1957 b). — Ders., *Nature* **179**, 800 (1957 c). — OIKAWA, A., und MAEDA, A., *J. Biochem.* **44**, 745 (1954). — OIKAWA, A., *J. Biochem.* **46**, 463 (1959). — PECHMANN, E., *Biochem. Z.* **321**, 549 (1951). — PERLMANN, D., *J. Bact.* **49**, 167 (1945). — Ders., *Bot. Rev.* **15**, 195 (1949). — RAVEUX, R., *Compt. rend.* **231**, 106 (1950). — RENNERFELT, E., *Planta* **22**, 221 (1934). — ROBERG, M., *Zbl. Bakter. II*, **74**, 333 (1928). — ROCHFORD, E. J., and MANDLE, R. J., *J. Bact.* **66**, 554 (1953). — SANDELL, E. B., *Colorimetric Determinations of Traces of Metals*. New York 1944. — SCHULTZE, M. O., und KUIKEN, K. A., *J. Biol. Chem.* **137**, 727 (1941). — SHU, P., *Agric. Food Chem.* **1**, 1119 (1953). — SIMKIN, J. L., *Ann. Rev. Biochem.* **28**, 145 (1959). — SIMONART, P., und CHOW, K. Y., *Ant. van Leeuwenhoek* **20**, 210 (1954). — SMIRNOV, L. S., *Microbiology* **27**, 193 (1958). — SPICHER, G., *Zbl. Bakter. II* **109**, 259 (1954). STAPP, C., und WETTER, C., *Landw. Forsch.* **5**, 167 (1953). — STARKA, J., *C. A.* **49**, 1874 (1955). — STEINBERG, R. A., *Amer. J. Bot.* **6**, 330 (1919). — Ders., *Arch. Biochem.* **28**, 111 (1950). — TAMIYA, H., *C. A.* **23**, 177 (1929). — TKHOMIROVA, A. S., *Microbiology* **28**, 40 (1959). — TOMLINSON, N., CAMPBELL, J., und TRUSSAL, R. C., *J. Bact.* **61**, 17 (1951). — UNDRITZ, E., *Münch. Med. Wschr.* **99**, 467 (1957). — VALLEE, B. L., *Advanc. Protein Chem.* **10**, 317 (1955). — WALKER, J. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 1 (1953). — WASSILJEW, G., *Arch. Mikrobiol.* **6**, 250 (1935). — YAMAGATA, K., et al., *C. A.* **49**, 16 048 (1955).

Anschrift des Verfassers:

Dr. Karl Steiner, Institut für landw. Bakteriologie und Gärungsbiologie der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich 6, Universitätsstr. 2.



## Summary

The influence of Zn, Fe, Cu, Mn, and Mg on the growth of *Aspergillus oryzae* and on the formation of amylolytic and proteolytic enzymes has been studied. The effect of various carbon sources on the formation of dextrinogenic amylase under defined trace element conditions has also been investigated. For these purposes, both preparatory detailed investigations on purification techniques and studies on optimum conditions for amylase formation, with respect to composition and buffering of the medium, were found necessary. The following results have been obtained:

a) Influence of trace elements on growth and enzyme formation

1. For optimal growth in a purified medium containing 15 g maltose, 40 g phosphate buffer pH 6,0, and 1,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  per liter (nutrient soln. B), the following amounts of trace elements are required: 200  $\gamma$  — 1 mg Zn, 200  $\gamma$  — 10 mg Fe, 40  $\gamma$  — 200  $\gamma$  Cu and 15 — 100 mg Mg. Slight decrease in the amounts of any of the above mentioned trace elements retards or prevents spore formation. Pronounced deficiency of any of these elements depresses the dry weight of mycelium. Excess of any of these elements also retards or inhibits sporulation and decreases the dry weight, but to a lesser degree than in the case of deficiency.
2. The growth of the fungus in a Cu-deficient medium follows a different pattern from that of media deficient in Zn, Fe or Mg. The patterns of growth in a Cu-deficient and in a complete medium are similar. In both the dry weight reaches a maximum after about 5 days and then gradually falls due to progressive autolysis. If any of the other trace elements is deficient, the mycelial dry weight continues to increase even after 10 days of growth.
3. The formation of amylolytic enzymes is influenced by the trace elements in the following way:

Zn: Maximum formation of amylase was obtained with 60  $\gamma$  — 200  $\gamma$  Zn/liter. Higher concentrations inhibited amylase production. The specific dextrinogenic activity decreases with increasing Zn-concentration.

Fe: With increasing concentration of Fe amylase formation also increases. Highest yields of amylase were obtained with growth inhibiting Fe-concentrations of 10 and 100 mg/liter.

Cu: In a Cu-deficient medium, amylase formation was higher than at optimal Cu-concentrations for growth.

Mn: No influence was observed between 0 and 20 mg/liter. 40 mg/liter inhibited amylase formation.

Mg: Highest amylase formation was observed on media with 30—100 mg/liter. In Mg-deficient medium, the specific dextrino-

genic activity is diminished. Addition of Ca to a Mg-deficient medium increases the inhibition of amylase formation.

4. For the formation of proteolytic enzymes, Zn and Fe are essential. The culture filtrates practically show no proteolytic activity unless the concentrations of Zn and Fe are sufficient for maximum growth. In a medium deficient in Mg, more proteolytic enzymes are produced than at optimal Mg-concentrations for growth. The same applies, though to a lesser degree, to deficiency of Cu or excess of Fe.
- b) Influence of various carbon sources on the formation of dextrinogenic amylase
1. In purified nutrient solution B, with trace elements added, more amylase is produced with dextrin as carbon source than with maltose, starch, or glucose. Maltose and starch gave about equal yields of amylase. Glucose ranged as the poorest carbon source for amylase formation.
  2. In unpurified nutrient solution B, with trace elements added, however, more dextrinogenic amylase was formed with maltose as carbon source than with dextrin.
  3. In comparison to the specific dextrinogenic activity of the corresponding complete media, Cu-deficiency resulted with all carbon sources in a higher specific dextrinogenic activity, Fe-deficiency with glucose and starch in a higher, with dextrin and maltose in a lower, and Zn-deficiency with glucose, maltose and starch in a higher, and with dextrin in a lower specific dextrinogenic activity.
- c) Influence of pH and nitrogen sources on the formation of dextrinogenic amylase
1. The formation of amylase in nutrient solution B is highest at pH 5.5, decreases toward pH 7.0, and slightly increases again toward pH 8.0. Below pH 5.5, the dextrinogenic amylase is unstable at the incubation temperature of 25° C.
  2. With  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  higher amylase yields were obtained than with peptone, urea, and glutamic acid, if the N-concentration of the media corresponded in every case to 2.0 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  per liter.
- d) Purification technique
1. With the  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -method of DONALD et al. (1952) it was easy in our laboratory to reproduce their low zero values for Zn and Fe, but not those for Cu and Mn. The application of several modifications to this method gave only small reductions of the Cu- and Mn-zero values.
  2. For purification of the heavily buffered nutrient solution B, as especially developed for the enzymatic investigations, an extraction method with dithizon and oxine proved to be better suited than the above mentioned  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -method.

## Dank

Dem Vorstand des Institutes für landw. Bakteriologie und Gärungsbiologie, Herrn Prof. Dr. L. ETLINGER, möchte ich für seine persönliche Anteilnahme, sowie für die allseitige Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit meinen vorzüglichen Dank aussprechen.

Herrn Dr. J. MEYRATH danke ich bestens für die Zuweisung des Themas und die wertvollen Anregungen.

Allen Institutsmitgliedern, die mir behilflich waren, danke ich freundlichst für ihre sorgfältige Arbeit. Besonderen Dank schulde ich Frl. A. MOHLER für das Maschinenschriften des Manuskripts. An dieser Stelle sei auch Frau L. MÜLLER für die Reinschrift des Manuskripts herzlich gedankt.

## Lebenslauf

Geboren am 5. Oktober 1932 in Rüti/Zch.

1939—1945 Primarschule in Unterholz - Hinwil.

1945—1948 Sekundarschule in Hinwil.

1948—1952 Kantonale Oberrealschule Zürich.

Maturität Typ C im Herbst 1952.

1952—1953 Praktikum in der Mosterei Zweifel Zch-Höngg, Militärdienst.

1953—1957 Studium an der Eidgenössischen Technischen Hochschule,

Abteilung für Landwirtschaft

agrotechnologische Richtung.

Praxis an der Eidg. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und

Gartenbau in Wädenswil.

Diplom als Ing. Agr., agrotechnologische Richtung im Herbst

1957.

1957—1960 Assistent am Institut für landw. Bakteriologie und Gärungs-  
biologie. Ausführung der Promotionsarbeit.