

Prom. Nr. 2698

ÜBER DIE BILDUNG VON
AMYLASEN DURCH
ASPERGILLUS FLAVUS-ORYZAE

VON DER
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH
ZUR ERLANGUNG
DER WÜRDE EINES DOKTORS DER
TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE
PROMOTIONSARBEIT
VORGELEGT VON
Joseph Meyrath
Dipl. Ing.-Agr.
Luxemburgischer Staatsangehöriger

Referent: Herr Prof. T. O. Wikén
Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Deuel

1957

Verlag P. G. Keller Winterthur

5. Zusammenfassung

a) Zur Methodik der amylytischen Aktivitätsbestimmung

Die Methodik der amylytischen Aktivitätsbestimmung wurde überprüft und ausgebaut. Es zeigte sich, dass die Analyse eines Gemisches verschiedener Amylasen sehr schwer durchzuführen ist, sofern man nicht sich darauf beschränkt, die Summe der Wirkung aller vorhandener Enzyme durch die dextrinogene oder saccharogene Aktivität auszudrücken.

Die Bestimmung der dextrinogenen Aktivität lässt sich gut nach einer von verschiedenen Autoren abgeänderten Wohlgemuth-Methode bestimmen. Als Mass der Aktivität wird dabei der reziproke Wert der Dextrinisierungszeit genommen. Unter Dextrinisierungszeit wird hier die Zeit verstanden, die es braucht, um eine standardisierte Stärkelösung so weit abzubauen, dass sie mit Jod eine charakteristische rotbraune Färbung ergibt. Als Standardfärbung eignet sich gut eine Mischung von Co- und Cr-Salzen.

Genauer lässt sich die dextrinogene Aktivität durch spektrophotometrische Verfolgung der Jod-Stärke- oder Jod-Amylose-Färbung bestimmen. Für die Amylasen von *Aspergillus flavus-oryzae* erwies sich diese Methode besonders wertvoll, weil eine lineare Abnahme der Farbintensität der Jod-Stärke- und Jod-Amylose-Färbung mit der Reaktionszeit erfolgt; dies gilt bis zu 30–35% des Ausgangswertes. Diese Linearität gilt z. B. nicht für reine Gersten- α - und Gersten- β -Amylase, wenn die Aktivität dieser Enzyme auf Amylose verfolgt wird. Im Gegensatz zu den α -Amylasen wird durch Einwirkung von β -Amylase auf Amylose das Absorptionsmaximum der Jod-Amylose-Färbung über einen grossen Teil der Reaktion nicht nach kürzeren Wellenlängen verschoben. Auf Grund der erwähnten Eigenschaften ist mit dieser spektrophotometrischen Methode die Möglichkeit gegeben, verschiedene Amylasen voneinander zu unterscheiden.

Die Bestimmung der saccharogenen Aktivität wurde durch die Erfassung der freigesetzten reduzierenden Gruppen mit der Sumner-Methode durchgeführt. Die Bestrebungen gingen auch hier darauf hinaus, die Abbaureaktion über einen möglichst grossen Bereich auf rechnerische Weise erfassen zu können. Es wurde eine Formel entwickelt, welche den nicht linearen Verlauf der Zunahme der reduzierenden Gruppen (gemessen an der Extinktion E der Reagenslösung) mit der Zeit charakterisiert: $K = E \left(\frac{1}{c \times t} + b \right)$. Diese Formel gilt bis zu etwa 40% des maximal möglichen Abbaus (gemessen an der Farbintensität der Reagenslösung). Verglichen mit andern Methoden, welche nur Gültigkeit bis zu etwa 10% des

maximal möglichen Stärkeabbau haben (approximative Linearität zwischen Abbaugrad und Reaktionszeit), bietet diese Methode den Vorteil, den Reaktionsmechanismus besser erfassen zu können. Ausserdem ist man unabhängig von der Konzentration der Enzymlösung.

Wenn auch mit den ausgearbeiteten Methoden unter Umständen eine Verschiebung des relativen Anteils der einzelnen Amylasekomponenten in einem Gemisch festgestellt werden kann, so erlauben sie doch nicht, jene quantitativ zu erfassen; es ist notwendig, die betreffenden Komponenten zu isolieren und zu charakterisieren, um die günstigsten Bedingungen auszuwählen, welche es ermöglichen, die Aktivitätsbestimmung auch in Begleitung der andern Enzyme durchzuführen. Um dieser Notwendigkeit gerecht zu werden, wurde versucht, mit Hilfe von Ionenaustauschern eine Trennung der *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase in ihre Komponenten vorzunehmen. Studien an reiner Gersten- α -Amylase zeigten, dass es unter günstiger Wahl der Bedingungen (Enzymmenge, pH des Elutionsmittels, Durchflussgeschwindigkeit, Kolonnenhöhe, Temperatur) möglich ist, dieses Enzym an Dowex-50 (schwach vernetzte Form) zu adsorbieren und auch zum Teil wieder zu eluieren. Durch die Adsorption wird ein Teil des Enzyms inaktiviert und dies sogar bei 0°C; bei Zimmertemperatur findet fast vollständige Inaktivierung statt. Es sei aber hervorgehoben, dass die Kapazität dieses Austauschers für Proteinadsorption sehr klein ist. Trennungsversuche mit Hilfe von Dowex-50 an *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase liessen durch pH-Wechsel des Elutionsmittels wohl eine Auftrennung des Eluates in verschiedene Komponenten vornehmen, aber diese waren nicht rein. Es konnte eine Komponente sehr schwacher Aktivität bei hohem pH-Wert eluiert werden, welche sich von den andern durch ihre Jodunempfindlichkeit unterschied.

Einige Trennungsversuche mit Hilfe des Austauschers Amberlite-XE-64 ergaben, dass bei pH 6 etwa 10% der Aktivität von *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase zurückbehalten wird, gemessen an der dextrinisierenden Wirkung. Ferner sind in den untersuchten drei Präparaten 2 schwache Komponenten nachweisbar, welche bei weiterer Elution hervortreten. Die Verschiedenheit dieser Komponenten von der ersten Komponente wurde nicht nachgewiesen.

b) *Zu den Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Diastase-Bildung durch Aspergillus flavus-oryzae bei Kultivierung auf Weizenkleie*

Die Bildung von Amylasen durch *Aspergillus flavus-oryzae* auf Kleie wird von verschiedenen äusseren Faktoren beeinflusst. Es wurde die Wechselwirkung von Temperatur, Wassergehalt und Schichthöhe der Kleie unter Berücksichtigung der Bebrütungszeit auf die dextrinogene Aktivität untersucht. Durch Standardisierung der Kulturmethoden konnte eine genügend gute Reproduzierbarkeit erreicht werden. Die zur Erreichung der maximalen Aktivität nötige Bebrütungszeit wird, abgesehen von der Temperatur, nur wenig von den oben genannten Faktoren beeinflusst; die maximale

Ausbeute an dextrinogenen Enzymen ist aber empfindlich von ihnen abhängig (vgl. Fig. 26 und 27). Die wichtigsten Charakteristika dieser Wechselwirkung sind schon unter „Allgemeine Schlüsse“, S. 69, zusammengefasst. Als innere Ursachen dieser Wechselwirkung werden, zum Teil wenigstens, die Beeinflussung des Gasaustausches sowie Temperaturveränderungen im Kleie-Innern angesehen.

Das Alter der Impfkultur (zwischen 10 und 290 Tagen) wirkt sich auf die maximale Ausbeute an dextrinogenen Amylasen nicht aus. Die Enzymproduktion bei Anwendung alter Impfkulturen wird anfänglich etwas verzögert; die maximale Ausbeute wird aber ungefähr zu gleicher Zeit erreicht. Diese anfängliche Verzögerung wird auf die geschwächte Keimfähigkeit der Konidien alter Kulturen zurückgeführt.

Von grosser Bedeutung für die Bildung von Amylasen durch *Aspergillus flavus-oryzae* ist das pH im Kleiesubstrat. Ein pH von 5 ergibt schon bemerkenswerte Depressionen in der Aktivität. Bei pH 4 werden nur sehr geringe Ausbeuten erzielt. Durch Zusatz von Natronlauge bis auf einen pH-Wert von 6,7 wird die Ausbeute nicht verringert. Bei diesen pH-Versuchen wurde auch die saccharogene Aktivität verfolgt. Es konnte unter keinen Bedingungen eine Änderung im Reaktionsmechanismus der verzuckernden Enzyme bis zu 40% des Stärkeabbaus festgestellt werden; d. h. die oben angegebene Formel zur Berechnung der saccharogenen Aktivität konnte immer angewendet werden. Im Verlauf der Kulturzeit ändert sich das Verhältnis von der dextrinogenen Aktivität zur saccharogenen Aktivität ein wenig, so dass auf eine gewisse Verschiebung des relativen Anteils der einzelnen Komponenten zu schliessen ist.