

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

Leer - Vide - Empty

Meiner lieben Frau
und meiner lieben Mutter

Leer - Vide - Empty

Vorwort

Diese Untersuchungen wurden am Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich ausgeführt. Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor T. Wikén, Vorstand des genannten Instituts, bin ich für sein allseitig grosszügiges Entgegenkommen und für die stetige Förderung meiner Arbeit zu tiefstem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. H. Müller, Müllerbräu A.-G., Baden, danke ich herzlich für die freigebige Unterstützung dieser Untersuchungen.

Dem Schweizerischen Schulrat danke ich aufrichtig für die Erteilung einer Prämie aus dem Marc Birkigt-Stipendienfonds.

Allen Institutsmitgliedern, welche mir behilflich waren, möchte ich für ihre sorgfältige Arbeit bestens danken.

Leer - Vide - Empty

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Umriss der Arbeit	9
2. Methodik	10
21. Bestimmung der diastatischen Aktivität	10
211. Problemstellung	10
212. Einige Methoden zur Bestimmung der diastatischen Aktivität	13
2121. Bestimmung des Dextrinisierungsvermögens	13
2122. Bestimmung des Verzuckerungsvermögens	25
213. Versuche zur Trennung von Amylasen an Ionenaustauschern	40
2131. Nähere Umschreibung des Problems.	40
2132. Technik des Arbeitens mit Ionenaustauschern	41
2133. Versuche mit reiner Gersten- α -Amylase an Dowex-50	41
2134. Trennungsversuche mit Diastase-Präparaten und frischen Enzymextrakten von <i>Aspergillus flavus- oryzae</i>	45
22. Kultivierungsmethoden und Substrataufarbeitung	48
221. Herstellung des Kleienährbodens	48
222. Impfmaterial und Impftechnik	48
223. Aufarbeitung des Substrates	50
3. Prüfung einiger <i>Aspergillus flavus-oryzae</i> -Stämme auf die Bildung dextrinisierender Enzyme	52
4. Einige Faktoren, welche die diastatische Aktivität in Kulturen von <i>Aspergillus flavus-oryzae</i> beeinflussen	53
41. Wechselwirkung von Bebrütungstemperatur, Wassergehalt und Schichthöhe der Kleie auf die Bildung dextrinogener Enzyme	53

411. Vorversuch: Einfluss der Temperatur bei zwei Schichthöhen	53
412. Nähere Umschreibung des Problems und Versuchsübersicht	55
413. Besprechung der Ergebnisse	63
414. Diskussion über die Wechselwirkung von Temperatur, Wassergehalt und Schichthöhe der Kleie	69
42. Einfluss des Alters der Impfkultur	72
43. Einfluss des pH im Kleiesubstrat auf die Bildung diastatischer Enzyme	76
5. Zusammenfassung	79
6. Zusammenstellung einiger oft verwendeter Symbole	82
7. Literaturverzeichnis	83

1. Einleitung und Umriß der Arbeit

Viele Schimmelpilze sind für ihre Eigenschaft bekannt, recht aktive Enzyme in das Kultursubstrat auszuschleiden. Die Bildung von Amylasen und andern Enzymen wird sogar technisch ausgenutzt (58, 72). Für die Gewinnung von Amylasen werden meistens Pilze aus der Gruppe *Aspergillus flavus-oryzae* herangezogen. Als Kultursubstrat hat sich vor allem Weizenkleie als geeignet erwiesen. Die meisten veröffentlichten Untersuchungen, davon eine grosse Zahl japanischer Arbeiten, wurden in halbertechnischem oder technischem Masstab durchgeführt; aus diesem Grunde musste infolge des grossen Aufwandes die Zahl der Variablen beschränkt werden, was die Kenntnisse auf diesem Gebiet natürlich weniger förderte.

Von hervorragender Bedeutung und besonderer Schwierigkeit für diese Untersuchungen ist die Methodik der enzymatischen Aktivitätsbestimmung, da es mehrere Enzyme sind, welche sich am Stärkeabbau beteiligen. Es sind Anstrengungen gemacht worden, die Methoden zu standardisieren, indem die Summenwirkung aller vorhandener Amylasen in dextrinogenen und saccharogenen Einheiten ausgedrückt wird (4, 11, 28, 30, 31, 44, 45, 59, 60, 69, 76). Es sind aber bisher noch keine Methoden ausgearbeitet worden, um alle am Stärkeabbau beteiligten Enzyme einzeln zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Methodik der Aktivitätsbestimmung der Amylasen zu verbessern, wobei das Problem der getrennten Erfassung mehrerer Amylasen in einem Gemisch auch Beachtung fand. Zu gleicher Zeit wurden aber auch Versuche ausgeführt über den Einfluss einiger Faktoren auf die Diastase-Bildung von *Aspergillus flavus-oryzae* bei Kultivierung auf Weizenkleie, wobei die enzymatische Aktivität mit standardisierten Methoden verfolgt wurde.

2. Methodik

21. BESTIMMUNG DER DIASTATISCHEN AKTIVITÄT

211. Problemstellung

In den Kulturen von *Aspergillus flavus-oryzae* konnten bis jetzt 5 Enzyme nachgewiesen werden, welche sich am Stärkeabbau beteiligen. Es sind dies: α -Amylase, β -Amylase, Amyloglucosidase, Maltase und Grenz-dextrinase. Maltase und Grenz-dextrinase sind keine Amylasen, d.h. sie greifen das Stärkemolekül selber nicht an, können aber gewisse Spaltprodukte der Stärke noch weiter hydrolysieren. Deshalb ist es notwendig, diese Enzyme auch zu berücksichtigen, insbesondere, weil sie bei Aktivitätsbestimmungen von Amylasen stören können.

Die wichtigsten Eigenschaften der erwähnten Enzyme werden nachfolgend kurz beschrieben, weil sich auf diesen Charakteristika die Bestimmungsmethoden aufbauen.

a) α -Amylase

Aus Handelspräparaten der Diastase von *Aspergillus flavus-oryzae* ist die α -Amylase von Fischer et al. (17), sowie Underkofler et al. (71) in kristallinem Zustand gewonnen worden. Sie weist sehr ähnliche Eigenschaften auf wie die übrigen bekannten α -Amylasen anderer Herkunft (18, 61, 5, 6, 10, 12, 16, 33, 23, 25, 34, 39, 41, 47): Die 1,4-Bindungen der Stärke werden unter Bildung von Dextrinen geringen Molekulargewichts gespalten. Dadurch entsteht eine rasche Erniedrigung der Viskosität von Stärkelösungen und das Vermögen, mit Jod eine blaue Färbung zu bilden, verschwindet bald. Entsprechend der Zunahme der Menge der Dextrine nimmt die Reduktionswirkung gegenüber den üblichen Zuckerbestimmungsreagenzien zu. Es wurde noch nicht geprüft, ob reine α -Amylase von *Aspergillus flavus-oryzae* auch Dextrine weiter zu Maltose und Glucose zu spalten vermag, wie es die übrigen α -Amylasen anderer Herkunft imstande sind (5, 12, 23, 25, 41, 45, 46, 54, 55, 56, 74); sogar Maltotetraose und Maltotriose können durch α -Amylasen zu Maltose und Glucose gespalten werden (54, 55, 56). Ob auch die α -Amylase von *Aspergillus flavus-oryzae* gleich wie Malzamyase zur Hydrolyse der 1,6-Bindungen der Stärke unfähig ist, wurde noch nicht untersucht.

b) β -Amylase

Von verschiedener Seite, vor allem von japanischen Autoren, wird das Vorhandensein von β -Amylase im Substrat von *Aspergillus flavus-oryzae*

erwähnt. Diese Befunde konnten aber nicht näher geprüft werden, und zwar infolge mangelnder Ausführlichkeit der Literaturzitate (32).

Die aus Malz (42), Weizen (43) und Batate (2, 3) in kristallinem Zustand gewonnenen β -Amylasen weisen alle die Eigenschaft auf, β -Maltose zu bilden, weshalb die optische Aktivität nach der positiven Seite zunimmt. Es werden nur α -1,4-Bindungen gespalten. An den Verzweigungsstellen des Stärkemoleküls bleibt die Abbaureaktion stehen. Es wird ein Grenz-dextrin gebildet, welches sich mit Jod noch rot färbt. Die Erniedrigung der Viskosität findet nur langsam statt, und die blaue Färbung mit Jod bleibt bestehen, bis die Stärke fast vollständig abgebaut ist (7, 24, 25, 37, 38, 73).

c) *Amyloglucosidase*

Vor allem in der japanischen Literatur wird über das Vorhandensein dieses Enzyms in Kulturen von *Aspergillus flavus-oryzae* berichtet (27, 52, 72). Wie es scheint, haben auch Drews et al. (15) Amyloglucosidase isolieren können. Das Enzym spaltet β -Glucose von den Stärkemolekülen ab, ohne dass Dextrine als Zwischenprodukte entstehen.

d) *Maltase*

In verschiedenen Literaturangaben wird die Bildung von Maltase durch *Aspergillus flavus-oryzae* erwähnt (44, 45). Bekanntlich vermag diese α -Glucosidase Maltose in 2 Glucosemoleküle zu spalten.

Die Bezeichnung Maltase ist oft angewandt worden für die saccharogenen Enzyme aus Kulturen von Schimmelpilzen, womit wahrscheinlich die Amyloglucosidase gemeint ist (72).

e) *Grenzdextrinase*

Das Enzym, welches die 1,6-Bindungen der Stärke zu spalten vermag, wurde auch in kristallinem oder gereinigtem Zustand gewonnen (71, 29, 67). Die kurzen verzweigten Oligosaccharide, welche als unabbaubare Grenzdextrine durch die Einwirkung der Amylasen entstehen, können durch dieses Enzym gespalten werden. Die aus andern Quellen isolierten Enzyme, welche die 1,6-Bindungen spalten, wurden mit α -1,6-Glucosidase und Amylo-1,6-Glucosidase bezeichnet.

Ob mit den aufgezählten 5 Enzymen alle am Stärkeabbau beteiligten Enzyme, welche in Kulturen von *Aspergillus flavus-oryzae* vorkommen, erfasst sind, ist noch fraglich. Die bisherigen Methoden der Enzymuntersuchung erlauben es nicht, diese Frage zu beantworten.

Aus der Aufzählung der Eigenschaften der erwähnten Enzyme gehen auch die Schwierigkeiten hervor, diese getrennt in einem Gemisch zu erfassen. Die Wirkung aller Enzyme ist charakterisiert durch eine Zunahme der reduzierenden Gruppen. Weder durch eine Messung der Zunahme der Reduktionswirkung, noch durch die spezifische Bestimmung von Maltose und Glucose kann die Aktivität einer einzelnen Amylase bestimmt werden, wenn die andern Enzyme vorhanden sind. Maltase und Grenzdextrinase

könnten infolge ihrer Substratspezifität auf Maltose bzw. α -Grenzdextrin bestimmt werden.

Auch das Dextrinisierungsvermögen der α -Amylase wird durch die Aktivität von β -Amylase und Amyloglucosidase beeinflusst. Immerhin stören diese Enzyme bei der Bestimmung der dextrinogenen Aktivität weniger, da sie das Stärkemolekül von den Enden her abbauen.

Durch die Bestimmung des Verhältnisses von dextrinogenem zu saccharogenem Vermögen hat man eine Möglichkeit, auf das Vorhandensein saccharogener Enzyme neben dextrinogenen Enzymen zu schliessen (9, 45). Eine quantitative Erfassung der einzelnen Enzyme ist aber nicht möglich.

Eine Methode, welche die Bestimmung von α -Amylase in Gegenwart von β -Amylase erlaubt, ist von Sandstedt et al. (62) ausgearbeitet worden. Sie ist auf der Feststellung begründet, dass die Dextrinisierungszeit eines Gemisches von α -Amylase und β -Amylase durch Zusatz einer genügend grossen Menge β -Amylase nicht mehr durch weitere Zugabe des letztgenannten Enzyms verkürzt wird. Zu unbekanntem Gemischen von α - und β -Amylase setzt man somit eine bestimmte Menge β -Amylase zu, so dass der Sättigungswert sicher erreicht wird. Die Dextrinisierungszeit der α -Amylase berechnet sich dann durch Zuschlag eines der gemessenen Dextrinisierungszeit proportionalen Betrages.

Die rein chemischen Eigenschaften der in Frage kommenden Enzyme sind auch noch nicht genügend bekannt, um auf diesen brauchbare Methoden der Aktivitätsbestimmung aufbauen zu können. So unterscheiden sich α - und β -Amylase wohl in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Hitze und Säure (51): α -Amylase ist besonders pH-empfindlich, während β -Amylase hitzeempfindlicher ist. Diese Eigenschaften wurden bisher nur für präparative Zwecke herangezogen (42, 43); es ist aber nicht ausgeschlossen, dass auch für analytische Zwecke diese Eigenschaften ausgenützt werden könnten.

Es ist zu beachten, dass die letztgenannte und die von Sandstedt et al. (62) angegebene Methode an Gersten-Amylasen ausgearbeitet worden sind. Ob sie auch für Enzyme von *Aspergillus flavus-oryzae* anwendbar sind, wäre noch zu prüfen. Dieser Pilz bildet auch nicht nur zwei Enzyme, was die Verhältnisse noch komplizierter erscheinen lässt.

Um einwandfreie Bestimmungsmethoden zur Analyse eines Enzymgemisches auszuarbeiten, müssen auf Grund der angestellten Überlegungen

1. Methoden vorhanden sein, welche eine Verschiebung des relativen Anteils der einzelnen Enzymkomponenten erkennen lassen, und
2. die betreffenden Enzyme in gereinigter Form gewonnen werden, damit ihre Eigenschaften bezüglich Hydrolysemechanismus und die rein chemisch-physikalischen Charakteristika untersucht werden können.

Es wurde in dieser Arbeit versucht, den erwähnten Anforderungen Rechnung zu tragen, und zwar durch die Überprüfung und den Ausbau vorhandener Aktivitätsbestimmungsmethoden und durch Trennungsversuche an Ionenaustauschern, um eine Reinigung der Enzyme zu erzielen

212. Einige Methoden zur Bestimmung der diastatischen Aktivität

Gemäss den Eigenschaften der beschriebenen Enzyme kann man folgende Methoden zur Aktivitätsbestimmung verwenden:

1. Bestimmung der optischen Drehung,
2. Bestimmung der Viskosität,
3. Bestimmung der Jod-Stärke-Färbung,
4. Bestimmung der reduzierenden Gruppen.

Die Bestimmung der optischen Drehung wäre für die Ermittlung der Aktivität reiner β -Amylase oder reiner Amyloglucosidase geeignet. In einem Gemisch kann aber die Aktivität der Komponenten einzeln nicht ohne weiteres ermittelt werden. Es sind zudem sehr klare Lösungen notwendig, und die Methode ist für serienmässige Untersuchungen weniger geeignet.

Viskositätsmessungen und die Bestimmung der Jod-Stärke-Färbung können für die Ermittlung des Dextrinisierungsvermögens herangezogen werden.

Die Methode der Bestimmung der freigesetzten reduzierenden Gruppen kann für alle Enzyme angewandt werden, wobei aber für Maltase und Grendextrinase nicht die Stärke selbst, sondern deren Abbauprodukte, nämlich Maltose bzw. niedermolekulare Dextrine und Oligosaccharide mit α -1,6-Bindungen, als Substrat dienen.

Nachfolgend werden einige Methoden beschrieben, welche auf ihre Eignung zur Bestimmung der dextrinogenen und saccharogenen Aktivität geprüft wurden.

2121. Bestimmung des Dextrinisierungsvermögens

Wie bereits erwähnt, eignet sich für diese Bestimmung entweder eine viskosimetrische Methode, oder eine solche, mit welcher die Abnahme der Färbbarkeit der Stärke mit Jod gemessen wird.

Auf die Anwendung einer viskosimetrischen Methode wurde vorderhand verzichtet, da unter Umständen auch andere Enzyme die Viskosität eines Stärkekleisters erniedrigen können, z. B. die Phosphatasen, welche die esterartig gebundene Phosphorsäure der Kartoffelstärke abspalten (45). Die viskosimetrischen Messungen sind allgemein auch nicht so beliebt, da die Reproduzierbarkeit der Messungen in starkem Masse von der Herstellung des Stärkekleisters abhängig ist (44, 45, 30).

Von den Methoden, bei welchen die Jod-Stärke-Färbung als Mass für das Dextrinisierungsvermögen genommen wird, sind es insbesondere die Modifikationen der Wohlgemuth-Methode (76), welche eine weit verbreitete Anwendung gefunden haben (4, 28, 31, 59, 60, 62, 69). Im Prinzip bestehen sie darin, die Zeit zu bestimmen, die es braucht, bis entweder die Jod-

Stärke-Färbung vollständig negativ ausfällt, oder bis die Färbung irgendeinen charakteristischen Farbton angenommen hat (in der Folge mit Dextrinisierungszeit bezeichnet).

Bernfeld und Fuld (8) haben eine ebenfalls auf diesem Prinzip beruhende Methode ausgearbeitet. Sie besteht darin, die Wirkung der Amylase nach 3 Minuten Reaktionszeit zu unterbrechen und die sich entwickelnde Färbung nach Zusatz von Jod mit einer künstlichen Farbskala zu vergleichen. Diese Methode konnte aber nicht als befriedigend angesehen werden, da die Übereinstimmung der Farbtöne zu wünschen übrig liess.

In der vorliegenden Arbeit wurde noch eine Methode ausgearbeitet, mit welcher die Jod-Stärke-Färbung spektrophotometrisch über den ganzen Reaktionsverlauf verfolgt wird. Auf diese Weise ist es möglich, etwas über die Kinetik des Stärkeabbaus des betreffenden Enzyms oder Enzymgemisches in Erfahrung zu bringen, was unmöglich ist, wenn man nur einen Punkt der Abbaukurve berücksichtigt, wie es bei der Bestimmung der Dextrinisierungszeit geschieht. An Hand kinetischer Studien soll es möglich sein, entscheiden zu können, ob ein bestimmtes Enzym im untersuchten Amylase-Gemisch vorhanden ist oder nicht. Darüber hinaus kann die Aktivitätsbestimmung mit grösserer Genauigkeit durchgeführt werden, da für die Berechnung mehrere Punkte der Abbaukurve berücksichtigt werden können.

*Zusammenstellung der Reagenslösungen,
welche für die Bestimmung des Dextrinisierungsvermögens gebraucht wurden*

- 1) Vorratsjodlösung (62): 11 g Jod und 22 g Kaliumjodid werden in 500 ml Wasser gelöst.
- 2) Verdünnte Jodlösung A (62): 15 ml der Jodvorratslösung und 20 g Kaliumjodid werden in 500 ml Wasser gelöst.
- 3) Verdünnte Jodlösung B (62): 2 ml der Vorratsjodlösung und 20 g Kaliumjodid werden in 500 ml Wasser gelöst.
- 4) Verdünnte Jodlösung C: 100 ml Jodlösung B werden mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
- 5) Farbstandard I (62): 0,6 g Dextrin Merck werden in wenig Wasser suspendiert und hierauf in ca. 900 ml siedendes Wasser gegossen. Nach dem Abkühlen wird auf 1 Liter ergänzt. Die Lösung wird mit einigen ml Toluol oder Xylol konserviert und ist so für viele Wochen gut haltbar. Für die Standardfarbvergleiche wird 1 ml der Dextrinlösung in ein Reagensglas pipettiert, das den gleichen Durchmesser hat wie diejenigen Röhrchen, welche für die Bestimmung der Jod-Stärke-Färbung verwendet werden. Sodann werden 5 ml der Jodlösung B zugesetzt.
- 6) Farbstandard II (59,60): 20 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
3 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
10 ml HCl , 0,1 n
 H_2O ad 100 ml

6 ml dieser Lösung werden in ein Reagensglas pipettiert, das den gleichen

Durchmesser hat wie diejenigen Röhren, die für die Bestimmung der Jod-Stärke-Färbung verwendet werden.

- 7) Stärkelösung (62): 10 g Stärke (Qualität ist jeweils angegeben) werden in ca. 30 ml Wasser suspendiert und in ca. 750 ml siedendes Wasser gegossen; die zurückgebliebenen Stärketeilchen werden mit 2 Portionen von ca. 20 ml Wasser ebenfalls in die kochende Stärkelösung übergespült. Das Wasser soll beim Hineinleeren der Stärkesuspension nicht aus dem Sieden kommen. Nach 2 Minuten weiterem Kochen wird die Lösung mit Leitungswasser auf 20° abgekühlt und nach Pufferung im Messkolben auf 1000 ml aufgefüllt. Es sollen nur frische Stärkelösungen verwendet werden.
- 8) Amylozelösung (5, 35, 36): 2 g Maisstärke werden in 5 ml Wasser suspendiert und sehr langsam zu 100 ml Wasser von 72° C gegeben. Die Temperatur wird während 30 Min. bei 68° bis 72° C gehalten, und die Stärke wird durch wiederholtes Rühren am Absetzen verhindert. Anschliessend wird mit fliessendem Leitungswasser abgekühlt, und die Suspension wird zentrifugiert, bis die überstehende Lösung klar ist (10 Minuten, 3000 U/Min.). Die klare Amylozelösung wird 5- bis 10mal verdünnt, nachdem die Pufferung auf das gewünschte pH erfolgt ist. Die Lösung soll für enzymatische Untersuchungen nicht älter sein als 24 Stunden.
- 9) Pufferung der Stärke- und Amylozelösung:
 - a) Pufferung auf pH 6 (28): Von einer Puffervorratslösung, welche 0,84 g $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ und 4,0 g KH_2PO_4 im Liter enthält, werden 50 ml pro Liter herzustellender Stärke- bzw. Amylozelösung zugegeben.
 - b) Pufferung auf pH 5,7: Pro Liter herzustellender Stärke- bzw. Amylozelösung werden unter Schütteln 100 ml NaOH ln zugegeben, und der pH-Wert 5,7 wird mit einer ca. 2 m Zitronensäurelösung eingestellt.

Bestimmung der Dextrinisierungszeit (vgl. 62, 69).

Ausführung: In ein dickwandiges Reagensglas (Fassungsvermögen etwa 60 ml) werden 20 ml Stärkelösung gegeben und in einem Wasserbad, versehen mit Umwälzpumpe und Kontaktthermometer, auf die gewünschte Temperatur gebracht (am zweckmässigsten 20° C). 10 ml einer ebenfalls auf 20° C temperierten Enzymlösung werden hinzupipettiert, die Zeit auf einem Chronometer gestoppt und die Reaktionslösung sofort gemischt. Von Zeit zu Zeit wird 1 ml der Enzym-Stärkelösung zu 5 ml der Jodlösung B gegeben und die sich entwickelnde Färbung vor einem hellen Hintergrund mit dem gewählten Farbstandard verglichen. Nähert sich die Farbintensität der zu prüfenden Lösung derjenigen des Farbstandards, so werden entsprechend der notwendigen Genauigkeit häufiger Proben entnommen.

Es wurde an Enzympräparaten des Handels und an frischem Enzymextrakt aus Kleie, die mit *Aspergillus flavus-oryzae* vergoren war, geprüft, ob zwischen dem reziproken Wert der Dextrinisierungszeit und der Enzymkonzentration Linearität herrscht.

a) *Versuche mit Enzympräparat „Diastase B. D. H.“*

Versuchsbedingungen:

Zulkowski-Stärke, 10 g/l, auf pH 6,0 gepuffert,
Farbstandard I.

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass im Bereich von 10 bis 100 mg Diastase die Enzymkonzentration dem reziproken Wert der Dextrinisierungszeit proportional ist, weil das Produkt $a \times t$ im Rahmen des Analysenfehlers konstant ist. Die Eichgerade ist in Fig. 1 dargestellt.

b) *Versuche mit Enzympräparat „Polidase-S, Schwarz“*

Versuchsbedingungen:

Zulkowski-Stärke, 10 g/l, auf pH 6,0 gepuffert,
Farbstandard I.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Konstanz des Produktes $a \times t$ lässt erkennen, dass für 1 bis 10 mg Enzympräparat Proportionalität zwischen dem reziproken Wert der Dextrinisierungszeit und der Enzymkonzentration herrscht (vgl. auch Fig. 1).

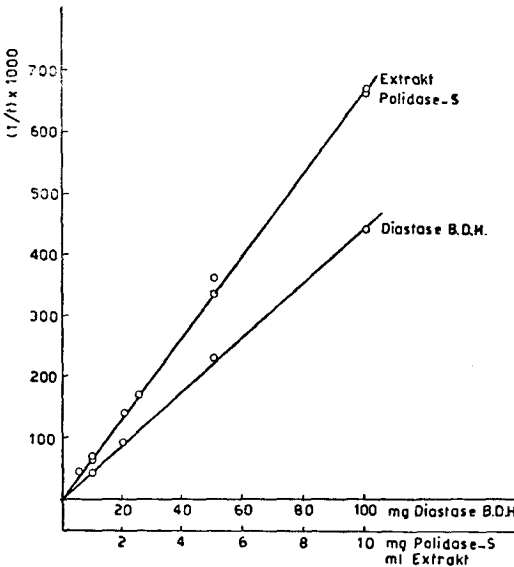


Fig. 1. Abhängigkeit der Dextrinisierungszeit von der Enzymkonzentration bei verschiedenen Diastase-Präparaten.

c) *Versuche mit frischem Enzymextrakt aus einer Kleie-Kultur von Aspergillus flavus-oryzae*

Versuchsbedingungen:

B. D. H.-Stärke, auf pH 5,7 gepuffert,
Farbstandard II.

Auch hier zeigt sich, dass über einen grossen Bereich (von $t = 1,5$ bis 150 Minuten) die Dextrinisierungszeit und die Enzymkonzentration linear voneinander abhängig sind (Tabelle 3, Fig. 1).

Tabelle 1

Die Abhängigkeit der Dextrinisierungszeit von der Enzymkonzentration
Enzympräparat „Diastase B. D. H.“

a	t	1/t	a × t
100	2,25	0,44	225
50	4,25	0,23	212
20	10,75	0,093	215
10	22,50	0,044	225

a = mg Enzym in 30 ml Enzym-Stärke-Gemisch,
t = Dextrinisierungszeit in Minuten.

Tabelle 2

Die Abhängigkeit der Dextrinisierungszeit von der Enzymkonzentration
Enzympräparat „Polidase-S“

a	t	1/t	a × t
100	0,5–0,75	~ 1,6	~ 60
50	0,5–0,75	~ 1,6	~ 30
20	1,1	0,91	22
10	1,5	0,66	15
5,0	2,75	0,36	13,6
2,0	7,0	0,14	14
1,0	14,5	0,069	14,5
0,5	23	0,043	11,5

a = mg Enzym in 30 ml Enzym-Stärke-Gemisch,
t = Dextrinisierungszeit in Minuten.

Tabelle 3

Die Abhängigkeit der Dextrinisierungszeit von der Enzymkonzentration
Frischer Enzymextrakt von *Aspergillus flavus-oryzae*

a	t	1/t	a × t
10	1,5 ± 0,1	0,667	15 ± 1
5,0	3,0 ± 0,1	0,333	15 ± 0,5
2,5	6,0 ± 0,2	0,167	15 ± 0,5
1,0	15 ± 0,5	0,0667	15 ± 0,5
0,5	30 ± 1	0,0333	15 ± 0,5
0,25	60 ± 2	0,0167	15 ± 0,5
0,10	150 ± 5	0,00667	15 ± 0,5

a = ml Original-Enzymextrakt pro 30 ml Enzym-Stärke-
Mischung,
t = Dextrinisierungszeit in Minuten.

d) *Einheiten der dextrinogenen Aktivität*

Die mit der unter c) beschriebenen Methode bestimmte Aktivität wird c_d bezeichnet, und die Einheiten werden in der Folge als $\frac{1}{t} 1000$ gewählt, wobei t die Reaktionszeit in Minuten ist.

e) *Einfluss der Stärkequalität auf die Dextrinisierungszeit*

Obschon die Bedeutung der Stärkequalität für enzymatische Untersuchungen nur an zwei Präparaten untersucht wurde, zeigen die nachfolgenden Zahlen doch, dass die Dextrinisierungszeit in empfindlicher Weise von der Stärkequalität beeinflusst werden kann.

Stärkequalität	Dextrinisierungszeit
B.D.H.	2,5 Minuten
Bender & Hobein	1,25 Minuten

Für enzymatische Untersuchungen ist es somit zu empfehlen, immer das gleiche Präparat, und zwar von guter Markenqualität zu verwenden, um die Reproduzierbarkeit zu garantieren.

Verfolgung des Stärke- und Amyloseabbaus durch spektrophotometrische Bestimmung der Jod-Stärke- (bzw. -Amylose-) Färbung

a) *Wahl der Reagenslösungen*

Die Jod-Stärke-Färbungen, wie sie von 1%igen Stärkelösungen erhalten werden, sind zu Beginn des enzymatischen Abbaus für eine spektrophotometrische Bestimmung viel zu dicht. Diese müssten etwa 10mal verdünnt werden, um in einen messbaren Bereich zu gelangen. Es erschien praktischer, verdünntere Stärkelösungen zu wählen, damit die erhaltene Färbung (1 ml Enzym-Stärke-Lösung + 5 ml Jodlösung) ohne weitere Verdünnung gut messbar sei.

Die Methode wurde vorerst an Amylose-Lösungen ausprobiert. Durch die Anwendung von Amylose ist der Vorteil gegeben, ein einheitliches Enzymsubstrat zu besitzen. Da β -Amylase die Amylose vollständig abbaut, kann auch die Aktivität dieses Enzyms mit der Jod-Amylose-Färbung spektrophotometrisch, und zwar vielleicht besser als mit der Jod-Stärke-Färbung, bestimmt werden.

Die Jodlösung B erzeugt eine sofortige Ausflockung der verdünnten Amyloselösung (blauer Niederschlag). Durch weitere Verdünnung dieser Jodlösung wurde erreicht, dass die Ausflockung nicht vor einer halben Stunde eintritt und sich somit nicht störend bei der Messung auswirkt. Tritt Ausflockung ein, bevor die Messung stattfindet, so kann der Niederschlag wieder aufgewirbelt und homogen verteilt werden. In Tabelle 4 wird gezeigt, dass bei Anwendung von 10 ml einer 5mal verdünnten Jodlösung B (= Jodlösung C) und 2 ml Amyloselösung der Anteil von Amylose mindestens so gross sein darf, dass ein Extinktionswert von 1,2 erreicht wird. Aus der Konstanz des Produktes Extinktionswert \times Verdünnungsgrad geht hervor, dass das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt ist.

Tabelle 4

Farbintensität der Jod-Amylose-Färbung als Funktion der Amylosekonzentration

V	4	10	20	40	100	200
E	1,20	0,480	0,240	0,122	0,048	0,025
V × E	4,80	4,80	4,80	4,88	4,80	5,00

V = Verdünnungsgrad der Amylozelösung,

E = Extinktion, gemessen im Beckman-Spektrophotometer bei 625 m μ , 10 mm Kuvette, Schlitz 0,05 mm.

Vergleichslösung = 5 ml Jodlösung C + 1 ml H₂O.

b) *Stabilität der Jod-Amylose-Färbung*

Die Stabilität der Färbung wurde untersucht mit und ohne Zusatz von Enzym. In beiden Fällen blieb die Farbintensität innerhalb 90 Minuten konstant.

Versuchsbedingungen:

a) 15 ml Jodlösung C + 1 ml H₂O + 2 ml Amylozelösung,

b) 15 ml Jodlösung C + 1 ml Enzymlösung (1 mg „Polidase-S“ pro 100 ml) + 2 ml Amylozelösung.

Extinktion nach Minuten:	8	30	90
a)	0,456	0,455	0,442
b)	0,456	0,455	0,442

Bei grösseren Enzymkonzentrationen wurden gelegentlich Instabilitätserscheinungen beobachtet. In diesen Fällen wurde möglichst sofort nach der Probenahme gemessen.

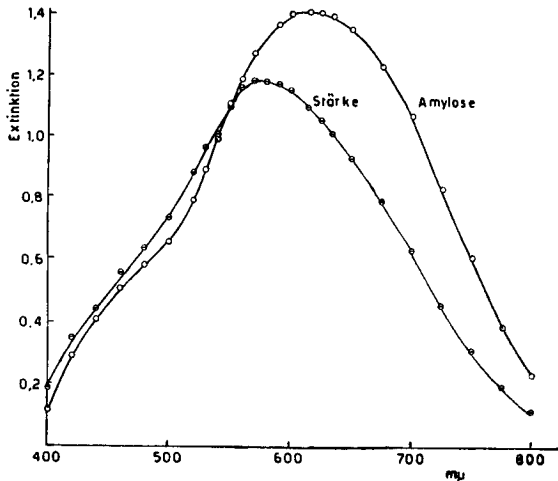


Fig. 2. Absorptionsspektren der Jod-Amylose und Jod-Stärke-Färbung.

c) *Verfolgung des Amyloseabbaus*

Nach verschiedenen Zeiten der Einwirkung von 10 ml Enzymlösung („Polidase-S“, 1 mg/10 ml) auf 20 ml Amyloselösung wurden die Spektren der Jod-Amylose-Färbung aufgenommen. Wie aus Fig. 3 ersichtlich ist, geht mit einer absoluten Abnahme der Farbintensität eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 615–625 $m\mu$ (vgl. Fig. 2) nach 540–550 $m\mu$ einher.

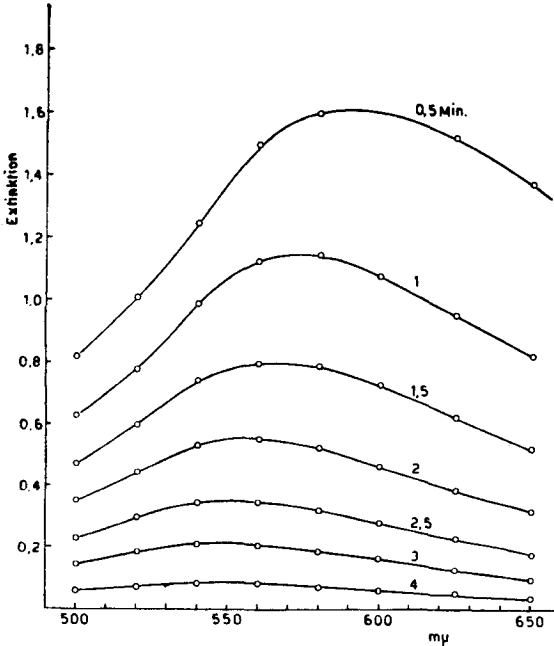


Fig. 3. Absorptionsspektren der Jod-Amylose-Färbung, nach verschiedenen Reaktionszeiten von Enzympräparat Polidase-S mit Amylose.

Einfluss der Enzymkonzentration auf den Amyloseabbau
Versuchsbedingungen:

Enzymlösung: Bierwürze, vergoren mit *Aspergillus flavus-oryzae*, 10 ml, enthaltend 1–10 ml unverdünnte Bierwürze,
Amyloselösung: 10mal verdünnt, auf pH 6,0 gepuffert, 20 ml,
Temperatur: 20°C,
1 ml Proben wurden entnommen und zu 5 ml Jodlösung C gegeben.

Die Extinktionswerte im Absorptionsmaximum (festgestellt durch zwei bis vier Messungen) der Jod-Amylose-Färbung, welche nach verschiedenen Zeiten des Abbaus erhalten wurden, sind in Fig. 4 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass anfänglich eine Abnahme der Farbintensität erfolgt, welche der Zeit proportional ist. Diese Messungen wurden nur bis zu etwa 50% des Ausgangswertes durchgeführt. Spätere Messungen zeigten, dass man bis zu 65–70% Abbau (35–30% des Ausgangswertes) lineare Kurven erhält.

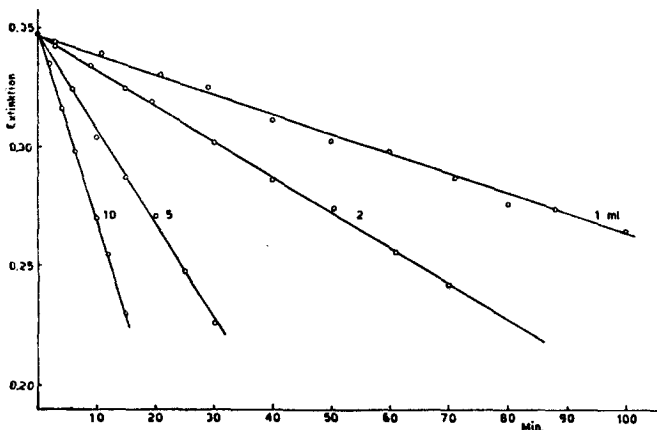


Fig. 4. Amyloseabbau bei verschiedenen Konzentrationen von *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase. Darstellung der Jod-Amylose-Färbung nach verschiedenen Reaktionszeiten.

Die mit dieser Methode bestimmte dextrinogene Aktivität, mit c_D bezeichnet, berechnet sich aus den Mittelwerten, welche sich ergeben aus Abnahme der Extinktion dividiert durch die entsprechende Reaktionszeit. In Tabelle 5 sind die bei verschiedenen Enzymkonzentrationen bestimmten c_D -Werte dargestellt.

Tabelle 5

*Dextrinisierungsvermögen als Funktion der Enzymkonzentration
spektrophotometrische Methode*

a	1	2	5	10
$c_D \times 1000$	0,838	1,48	3,90	7,90
$\frac{c_D \times 1000}{a}$	0,838	0,740	0,780	0,790

a = ml unverdünnte vergorene Bierwürze (*Aspergillus flavus-oryzae*) in 30 ml Enzym-Amylose-Mischung

c_D = dextrinogene Aktivität.

Aus der approximativen Konstanz von c_D/a und aus Fig. 5 geht hervor, dass zwischen der Enzymkonzentration und dem Dextrinisierungsvermögen Proportionalität herrscht.

Die vorliegende Methode lässt etwas über den Mechanismus des Abbaus erkennen. So sind die Abbaukurven von Amylose mit Gersten- α -Amylase weit davon entfernt, linear zu sein, auch nicht, wenn die Stärke nur bis zu 20% (gemessen an der Jod-Amylose-Färbung) abgebaut ist, wie es Fig. 6 zeigt. Man hat hier somit eine Möglichkeit, zwischen Amylasen verschiedener Herkunft zu unterscheiden.

Die Berechnung der Aktivität gestaltet sich bei diesem Reaktionsmechanismus schwieriger. Es zeigte sich, dass bei Anwendung frischer

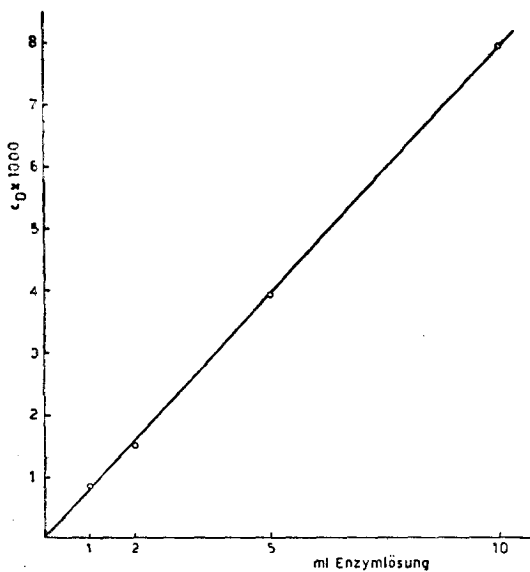


Fig. 5. Darstellung der dextrinogenen Aktivität als Funktion der Enzymkonzentration (Tangenswerte für verschiedene Enzymkonzentrationen aus Fig. 4).

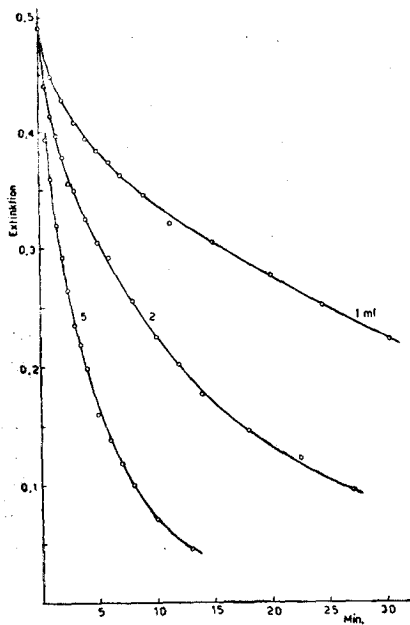


Fig. 6. Amyloseabbau bei verschiedenen Konzentrationen von Gersten- α -Amylase (Mann). Darstellung der Absorptionsmaxima der Jod-Amylose-Färbung nach verschiedenen Reaktionszeiten.

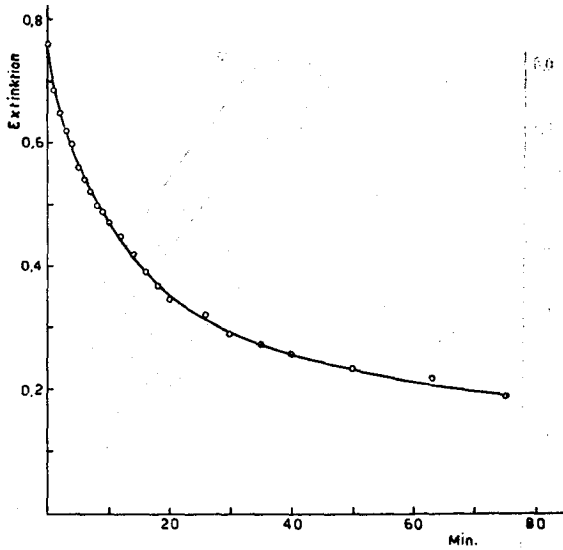


Fig. 7. Amyloseabbau mit Gersten- β -Amylase. Darstellung der Absorptionsmaxima der Jod-Amylose-Färbung nach verschiedenen Reaktionszeiten.

Amyloselösungen unbekannte Gersten- α -Amylaselösungen noch genau bestimmt werden können, wenn die Aktivität der zu prüfenden Lösung nicht um bedeutend mehr als 50% von der Aktivität einer Vergleichslösung abweicht. Die Berechnung geschieht in der Weise, dass für die unbekannte Enzymlösung und für die Standardlösung die Zeit bestimmt wird (durch graphische Interpolation), die es braucht, bis ein bestimmter Grad des Abbaus erreicht ist. Der reziproke Wert dieser Zeit ist ein Mass für die Aktivität.

Während bei den α -Amylasen mit der Abnahme der Farbintensität auch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums einhergeht, wird durch die β -Amylasen nur die Intensität der Jod-Amylose-Färbung vermindert. So wurde durch Gersten- β -Amylase die in Fig. 7 dargestellte Abbaukurve erhalten; dabei blieb das Absorptionsmaximum immer konstant bei 615 m μ .

d) Verfolgung des Stärkeabbaus

Der Abbau einer 0,1%igen Stärkelösung wurde ebenfalls nach dieser spektrophotometrischen Methode untersucht und in Fig. 8 und 9 dargestellt.

Versuchsbedingungen:

Stärkelösung: B. D. H., ungepuffert, 20 ml,

Enzymlösung: *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase (aus Kleiekultur);
Eluat von Ionenaustauscher, mit 0,2 m Na-Acetat,
pH 5,9 gepuffert, 10 ml,

Temperatur: 20°C,

1 ml Proben wurden entnommen und zu 5 ml Jodlösung C gegeben.

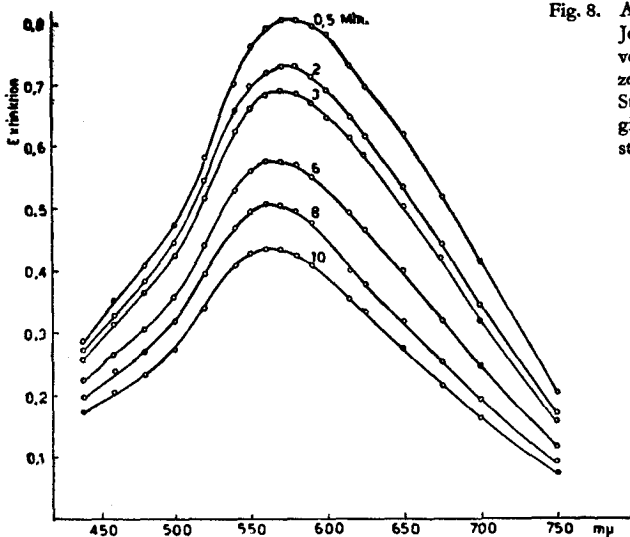


Fig. 8. Absorptionsmaxima der Jod-Stärke-Färbung nach verschiedenen Reaktionszeiten einer 0,1%igen Stärkelösung mit *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase.

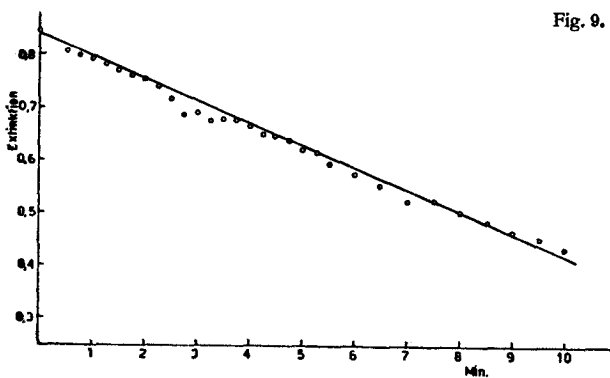


Fig. 9. Absorptionsmaxima der Jod-Stärke-Färbung (von Fig. 8) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Es ist ersichtlich, dass der Abbau summarisch ebenfalls linear erfolgt; es scheint, dass die Streuungen etwas grösser sind als bei Anwendung von Amylose. Eine sehr kleine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Jod-Stärke-Färbung findet statt, und zwar von 575–580 $m\mu$ auf 560–570 $m\mu$. Das Dextrinisierungsvermögen ϵ_D , berechnet sich zu 0,041. Der Versuch mit der gleichen Enzymlösung auf Amylose ergab einen ϵ_D -Wert von 0,0455. Die Differenz darf wohl auf Analysenstreuung zurückgeführt werden.

2122. Bestimmung des Verzuckerungsvermögens

Bekanntlich fusst diese Methode der Aktivitätsbestimmung auf der Erfassung der durch die Enzyme freigesetzten reduzierenden Gruppen. Deshalb wurden vorerst einige Methoden geprüft, welche der Erfassung reduzierender Zucker dienen.

a) Methoden zur Bestimmung von Glucose und deren polymeren Homologen

Methode nach Sumner

Die von Sumner ausgearbeitete (66) und von verschiedenen Autoren angewendete Methode (49, 26) schien für serienmäßige Aktivitätsbestimmungen sehr geeignet. Sie besteht darin, alkalische 3,5-Dinitrosalizylsäure auf die Zucker bei erhöhter Temperatur einwirken zu lassen und die dabei gebildete 3-Amino, 5-Nitrosalizylsäure (26) zu kolorimetrieren. Aus der Literatur (26) ist ersichtlich, dass das Absorptionsmaximum des gebildeten Farbstoffs bei $480\text{ m}\mu$ liegt. Für die Zuckerbestimmungen werden aber meist Wellenlängen von $540\text{--}530\text{ m}\mu$ verwendet. Um von der Wahl des besten Bereiches überzeugt zu sein, wurden Eichkurven für Glucose und Maltose für Wellenlängen von $500\text{--}560\text{ m}\mu$ aufgenommen. Diese sind in Fig. 10 und 11 dargestellt.

Bei Anwendung von Glucose als Testsubstanz herrscht Linearität zwischen Extinktion und Zuckerkonzentration (für $0,1\text{--}2\text{ mg}$ Glucose/ml) bei

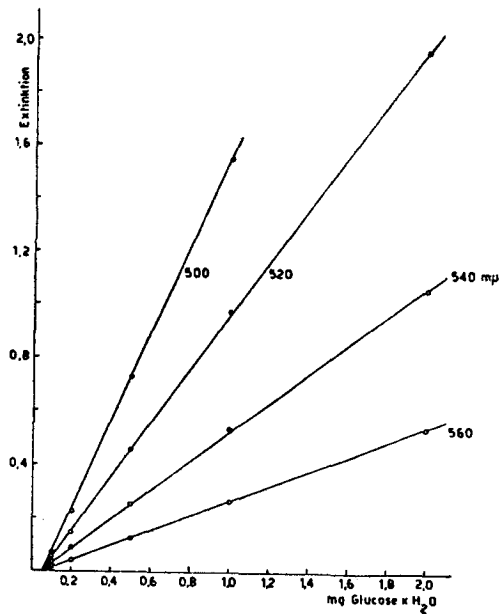


Fig. 10. Bestimmung von Glucose nach der Sumner-Methode. Extinktion als Funktion der Zuckerkonzentration bei verschiedenen Wellenlängen.

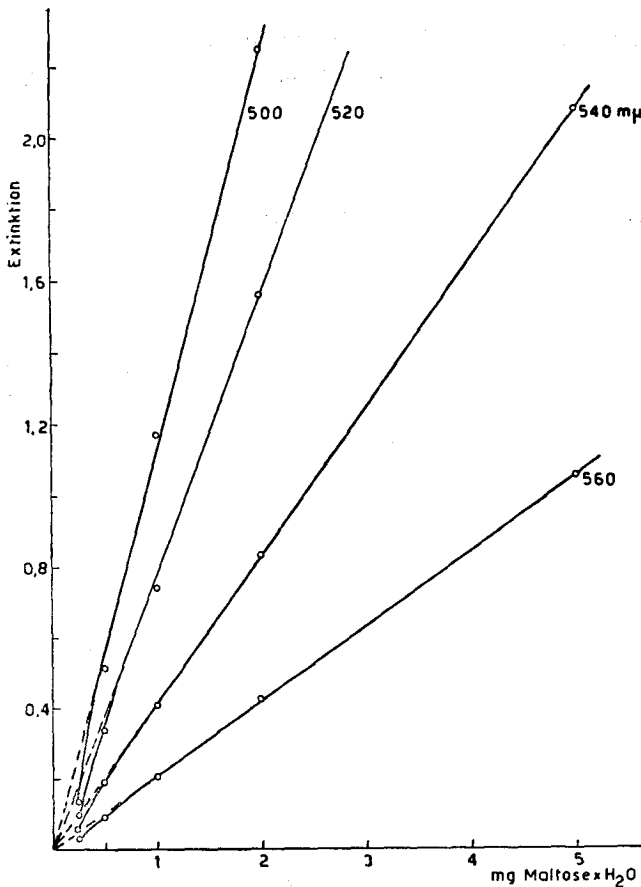


Fig. 11. Bestimmung von Maltose nach der Sumner-Methode. Extinktion als Funktion der Zuckerkonzentration bei verschiedenen Wellenlängen

den Wellenlängen von 520 μ und darunter. Für Messungen bei 500 μ sind die Färbungen oberhalb etwa 1,5 mg Glucose/ml zu dicht und können nicht mehr gemessen werden. Diese Lösungen müssen noch weiter verdünnt werden, um in einen günstigen Bereich zu gelangen.

Die Geraden bei 3 verschiedenen Wellenlängen ergeben folgende Gleichungen:

$$500 \mu \quad x = 0,554 \times \text{Ext.} + 0,054 \quad (0,1-1 \text{ mg Glucose/ml})$$

$$520 \mu \quad x = 0,887 \times \text{Ext.} + 0,054 \quad (0,1-2 \text{ mg Glucose/ml})$$

$$540 \mu \quad x = 1,65 \times \text{Ext.} + 0,047 \quad (0,1-2 \text{ mg Glucose/ml})$$

$$x = \text{mg Glucose/ml}$$

Ext. = gemessener Extinktionswert mit einer 10 mm Küvette.

Maltose ergab bei allen untersuchten Wellenlängen lineare Beziehungen zwischen 1–5 mg Maltose \times H₂O/ml. Diese Geraden gehen aber durch den Ursprung. Ober- und unterhalb der angegebenen Konzentration herrscht keine lineare Beziehung, wie es Fig. 11 und das Verhältnis von Extinktion zu Maltosekonzentration in der Tabelle 6 zeigen.

Tabelle 6

*Bestimmung von Maltose nach der Sumner-Methode
Darstellung des Verhältnisses von Extinktion zu Maltosekonzentration
bei verschiedenen Wellenlängen*

Maltose mg/ml	Wellenlänge m μ .			
	500	520	540	560
0,2	0,67	0,50	0,29	0,150
0,5	1,03	0,67	0,37	0,188
1,0	1,17	0,74	0,406	0,204
2,0	1,13	0,78	0,417	0,211
5,0	1,22	0,77	0,416	0,212
10,0	1,10	0,71	0,381	0,192

Die Farblösungen, welche sich bei Maltosekonzentrationen von 5 und 10 mg/ml ergaben, wurden 60mal verdünnt (statt 6mal wie in der nachfolgend beschriebenen Anleitung); ebenso die Farblösung des Blindwertes, um in einen messbaren Bereich zu gelangen. Dies war notwendig insbesondere für Wellenlängen unter 540 m μ .

Ausführung (49):

1 g 3,5-Dinitrosalizylsäure wird mit einigen Tropfen Wasser befeuchtet und unter Umschwenken mit 20 ml 1 n NaOH versetzt. Die Lösung wird sodann mit ungefähr 50 ml Wasser verdünnt. Nach vollständiger Auflösung der Dinitrosalizylsäure werden 30 g Seignette-Salz zugegeben, die Lösung auf 100 ml ergänzt und anschliessend durch einen Jenaer Glasfilter filtriert. Das Reagens ist unter Abschluss von Kohlensäure aufzubewahren.

Die Zuckerbestimmung wird ausgeführt, indem 1 ml Zuckerlösung zu 1 ml Reagens gegeben wird. Die Mischung wird während 5 Minuten in einem siedenden Wasserbad erhitzt und anschliessend in fließendem Leitungswasser gekühlt. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wird bei 540 m μ kolorimetriert, und zwar unter Verwendung einer Vergleichsprobe, welche genau wie eben beschrieben behandelt wurde, mit dem Unterschied aber, dass statt 1 ml Zuckerlösung 1 ml Wasser zugesetzt wird.

Die Messung geschieht am besten bei 540 m μ , da bei dieser Wellenlänge die Bestimmung genügend empfindlich ist; eine Verdünnung grösser als 6mal ist dann bei hohen Zuckerkonzentrationen nicht notwendig. Wird die Reaktionslösung im unverdünnten Zustand nach der Erhitzung aufbewahrt, dann ist die Färbung mindestens 24 Stunden stabil.

Methode nach Willstätter und Schudel (75), Ausführung nach der Originalvorschrift

Während mit der beschriebenen Methode von Sumner nicht der effektive Hydrolysegrad gemessen werden kann, weil für jeden Zucker und jedes Oligosaccharid der Stärkeabbauprodukte eine andere Eichkurve erhalten wird, soll es nach Angaben aus der Literatur mit der Willstätter-Schudel-Methode möglich sein, die beim Stärkeabbau freigesetzten reduzierenden Gruppen in stöchiometrischem Verhältnis zu bestimmen. Das Prinzip besteht darin, Natriumhypoiodit auf die Zuckerlösung bei Zimmertemperatur einwirken zu lassen und den Verbrauch an Jod zu messen, der durch die Oxydation der Aldehydgruppe zur Carboxylgruppe stattfindet.

Ausführung:

Zu 10 ml Zuckerlösung wird etwa der 1½- bis 4fache Überschuss an 0,1 n Jodlösung gegeben. Anschliessend wird unter Umschütteln tropfenweise die 1½fache Menge an 0,1 n NaOH zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten, bei sehr kleinen Konzentrationen besser 20 Minuten, bei Zimmertemperatur wird mit Schwefelsäure schwach angesäuert und der Verbrauch an Jod durch Rücktitration des Überschusses mit 0,1 bis 0,01 n Natriumthiosulfatlösung gemessen. Der Titer der Jodlösung wird eingestellt, indem 10 ml Wasser statt Zuckerlösung mit Jod und NaOH wie beschrieben versetzt werden.

Die Methode wurde geprüft an reinen Glucose- und Maltoselösungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt.

Tabelle 7

*Bestimmung von Glucose nach Willstätter-Schudel
(Ausführung nach der Originalvorschrift)*

Glucose µMol	505	101	50,5	25,2	10,1	5,05
Jod verbr. Aeq./Mol	2,07	2,09	2,02	2,09	2,00	2,14

Mittelwerte aus 2 Bestimmungen

Aus den Ergebnissen in Tabelle 7 berechnet sich ein mittlerer Verbrauch von 2,07 Aeq. Jod pro Mol Glucose. Die stöchiometrische Beziehung über den untersuchten Bereich von 0,00505 bis 0,505 mMol Glucose/10 ml ist somit gesichert.

Aus den Zahlen der Tabelle 8 berechnet sich der mittlere Verbrauch an Jod zu 1,93 Aeq. pro Mol Maltose. Man kann somit auch im Falle von Maltose annehmen, dass die stöchiometrische Beziehung gilt.

Tabelle 8

Bestimmung von Maltose nach Willstätter-Schudel
(Ausführung nach der Originalvorschrift)

Maltose μMol	278	55,6	27,8	13,9	5,56	2,78
Jod verbr. Aeq./Mol	1,92	1,91	1,97	1,90	1,91	1,98
Mittelwerte aus 2 Bestimmungen						

Bei dieser Methode ist das genaue Einhalten der Arbeitsvorschrift sehr wichtig. Die richtige Dosierung von Natronlauge ist beispielsweise von grosser Bedeutung; dies ist wohl an reinen Zuckerlösungen gut durchzuführen, aber bei Anwendung von Kultursubstraten und verschiedenen stark gepufferten Lösungen ist es schon schwieriger. In der Tat wurde festgestellt, dass unter solchen Bedingungen die Ergebnisse weniger gut reproduzierbar waren. Deshalb wurde versucht, durch Anwendung eines alkalischen Puffers diese variablen Einflüsse auszuschalten. Die Anwendung eines 0,2 m Natriumcarbonat-bicarbonat-Puffers wurde schon von Auerbach und Bodländer (1) vorgeschlagen.

Methodenach Willstätter und Schudel, modifizierte Ausführung

Zu 10 ml Zuckerlösung wird das 2- bis 4fache der stöchiometrisch notwendigen Menge an 0,1 n Jodlösung gegeben. Bei Glucose- und Maltosemengen von etwa 0,015 mMol und darunter ist das 4- bis 5fache an Jodlösung notwendig. Es wird die gleiche Menge 0,5 m Natriumcarbonatlösung wie Jodlösung zugesetzt; zutropfen ist nicht notwendig, wie bei der Anwendung von Natronlauge. Nach 35 bis 40 Minuten Reaktionszeit bei Zimmertemperatur wird mit Schwefelsäure schwach angesäuert und mit 0,1 bis 0,01 n Thiosulfatlösung unter Anwendung von Stärke zurücktitriert.

Tabellen 9 und 10 zeigen die Ergebnisse bei Anwendung von Glucose bzw. Maltose als Testsubstanz.

Tabelle 9

Bestimmung von Glucose nach Willstätter-Schudel
(modifizierte Ausführung)

Glucose μMol	505	75,7	30,3	10,1	5,05
Jod verbr. Aeq./Mol	2,04	2,03	1,88	1,81	1,98
Mittelwerte aus 2 Bestimmungen					

Tabelle 10

Bestimmung von Maltose nach Willstätter-Schudel
(modifizierte Ausführung)

Maltose μMol	139	55,6	5,56	2,78
Jod verbr. Aeq./Mol	1,94	1,92	1,80	1,87

Mittelwerte aus 2 Bestimmungen

Es wurde gefunden, dass Glucose im Mittel 1,95 Aeq. Jod pro Mo und Maltose 1,88 Aeq. Jod pro Mol Zucker verbraucht. Es konnten somit nahezu die theoretischen Mengen an reduzierenden Gruppen bestimmt werden. Sehr kleine Zuckermengen geben regelmässig etwas zu tiefe Werte. Der Fehler kann bis 10% ausmachen. Durch einen grösseren Jodüberschuss kann dieser systematische Fehler kompensiert werden, aber es nimmt dann die Ungenauigkeit der Bestimmung zu.

Die modifizierte Methode ergab für Maltoselösungen, welche auf pH 5,7 gepuffert waren (so wie die Stärkelösung für die enzymatische Aktivitätsbestimmung), die theoretisch zu erwartenden Werte. Es wurde bei diesen Bestimmungen zusätzlich 1 ml 0,5 m Natriumcarbonatlösung zugesetzt, um die 10 ml der auf pH 5,7 gepufferten Lösung bis auf ein pH von 10,4 zu bringen.

Methode nach Barfoed sowie Tauber und Kleiner, modifiziert nach Schelling (68, 48, 63)

Mit dieser Methode hat man die Möglichkeit, Mono- neben Disacchariden zu bestimmen. Im Hinblick auf eine möglichst vollständige Erfassung der Spaltprodukte des Stärkeabbaus ist eine solche Methode wertvoll. Auch für Aktivitätsbestimmungen von Maltase und Amyloglucosidase wäre eine derartige Methode besser geeignet als die üblichen Zuckerbestimmungsmethoden.

Das Prinzip der Methode besteht darin, dass Monosaccharide ein saures Kupferacetatreagens noch reduzieren, während Disaccharide sowie höhere Oligo- und Polymere dazu unfähig sind. Die gebildeten Kuproverbindungen reduzieren ein Molybdatreagens zu Molybdänblau, welches kolorimetriert wird.

Die Reaktion wurde durchgeführt an Glucose und Maltose. Da in der Literatur (63) auch bei dieser Methode verschiedene Wellenlängen angegeben sind, bei denen die Färbung gemessen wird, wurden ebenfalls wie

bei der Sumner-Methode die Eichkurven bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen. Fig. 12 zeigt die graphische Darstellung der Glucose Reaktion. Es geht hervor, dass zwischen 0,2 und 0,75 mg Glucose/ml Proportio-

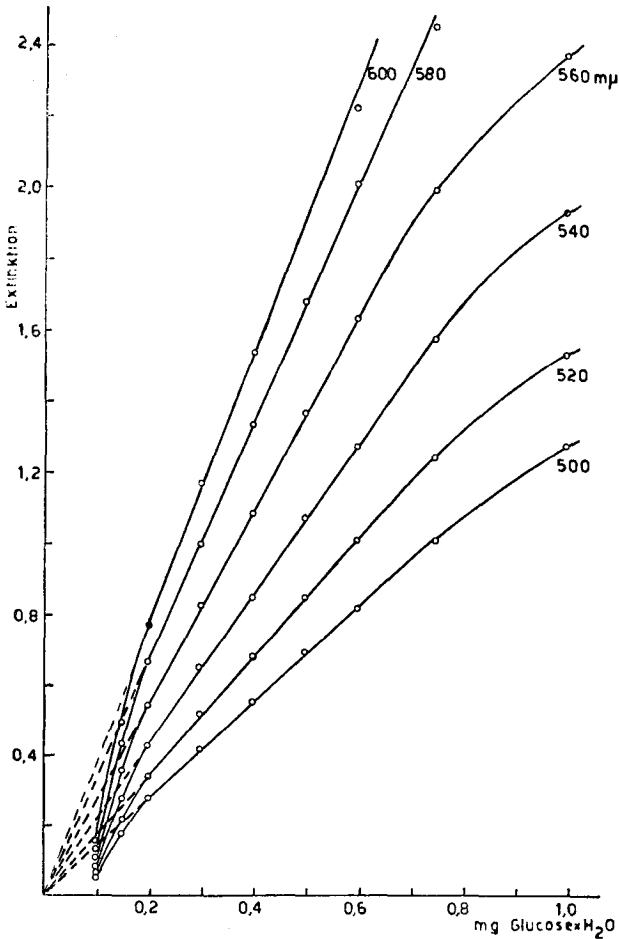


Fig. 12. Glucosebestimmung nach Barfoed, Tauber und Kleiner sowie Schelling. Extinktion als Funktion der Zuckerkonzentration bei verschiedenen Wellenlängen.

nalität zwischen Extinktion und Zuckerkonzentration herrscht. Um die beste Wellenlänge auszuwählen, wurde das Verhältnis von Extinktion zu Zuckerkonzentration bei verschiedenen Wellenlängen berechnet. Diese Werte sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11

Glucosebestimmung nach Barfoed-Tauber

Verhältnis von Extinktion zu Zuckerkonzentration bei verschiedenen Wellenlängen

Glucose $\times H_2O$ mg/ml	Wellenlänge $m\mu$								
	500	510	520	530	540	550	560	580	600
0,10	0,52	0,56	0,64	0,71	0,82	0,93	1,05	1,30	1,53
0,15	1,16	1,27	1,45	1,62	1,83	2,07	2,34	2,87	3,32
0,20	1,36	1,50	1,68	1,88	2,14	2,39	2,72	3,31	3,84
0,30	1,38	1,52	1,71	1,91	2,15	2,42	2,74	3,31	3,87
0,40	1,39	1,53	1,71	1,91	2,12	2,43	2,71	3,32	3,83
0,50	1,39	1,53	1,70	1,92	2,15	2,41	2,73	3,38	3,82
0,60	1,37	1,51	1,68	1,89	2,12	2,40	2,72	3,37	3,70
0,75	1,35	1,48	1,64	1,85	2,09	2,34	2,65	3,27	—
1,00	1,27	1,38	1,53	1,72	1,93	2,18	2,37	—	—

Mittelwerte aus 2 Bestimmungen

Tabelle 11 lässt erkennen, dass für Glucosekonzentrationen von 0,2 bis 0,75 mg/ml alle Wellenlängen von 500 bis 580 $m\mu$ gleich gut geeignet sind; das Verhältnis von Extinktion zu Zuckerkonzentration ist in diesem Bereich konstant. Oberhalb 580 $m\mu$ werden die Färbungen bei hohen Glucosekonzentrationen zu dicht. In der Folge wurde bei 540 $m\mu$ gemessen. Bei dieser Wellenlänge berechnet sich der Glucosegehalt nach der Gleichung:

$$\text{mg Glucose anhydr./ml} = 0,427 \times \text{Extinktion},$$

wobei die Extinktion in einer 10 mm Küvette gemessen wird.

Die Versuche an Maltoselösungen ergaben bei 1 mg Maltose $\times H_2O$ /ml kaum messbare Werte. Mit 2 mg/ml wurde bei 540 $m\mu$ im Mittel von 2 Bestimmungen ein Extinktionswert von 0,037 pro cm bestimmt. Das sind etwa 8% des kleinsten und 0,25% des höchsten brauchbaren Wertes der Glucose-Eichgerade.

Ausführung:

Reagenslösung I (68): 24 g Kupferacetat (Merck, p. a.) werden in 450 ml siedendem Wasser gelöst. Anschliessend werden sofort 25 ml einer 8,5%igen Milchsäurelösung zugegeben. Nach Abkühlung und Verdünnung auf 500 ml wird die Lösung von den ungelösten Bestandteilen durch Sedimentation befreit.

Reagenslösung II (48): 25 g Ammonmolybdat werden in 450 ml Wasser gelöst 21 ml H_2SO_4 konz. zugesetzt, gemischt und 3 g $Na_2HAsO_4 \times 7 H_2O$, gelöst in 25 ml Wasser, zugegeben und die Lösung gemischt. Die Lösung wird während 24 bis 48 Stunden in den Wärmeschrank von 35°C gestellt.

Die Bestimmung wird nach Schelling (63) ausgeführt, indem 1 ml neutrale Zuckerlösung und 1 ml Reagenslösung I in einem dünnwandigen Reagensglas während 6 Minuten in einem siedenden Wasserbad erhitzt und nach Abkühlung mit 1 ml der Reagenslösung II versetzt werden. Nach Verdünnung mit 10 ml Wasser wird bei 540 $m\mu$ im Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, die Farbtintensität unter Anwendung einer Vergleichslösung gemessen, welche analog angesetzt wird, aber keinen Zucker enthält.

b) *Verfolgung der Zunahme der reduzierenden Gruppen bei Einwirkung von Amylasen auf Stärke, an Hand der Sumner-Methode*

Die Zunahme der reduzierenden Gruppen wurde bei der Einwirkung eines Enzymauszugs einer Kleiekultur (*Aspergillus flavus-oryzae*) auf eine Stärkelösung (Merck, pH 5,2) bei verschiedenen Enzymkonzentrationen verfolgt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Fig. 13 dargestellt. Dieses Experiment bezweckte, eine Übersicht über den Spaltungsverlauf zu gewinnen und den maximal zu erreichenden Abbaugrad zu bestimmen. Die weiteren Untersuchungen waren dem ersten Teil des Stärkeabbaus gewidmet, um an Hand zahlreicher Probenahmen eine Formel aufstellen zu

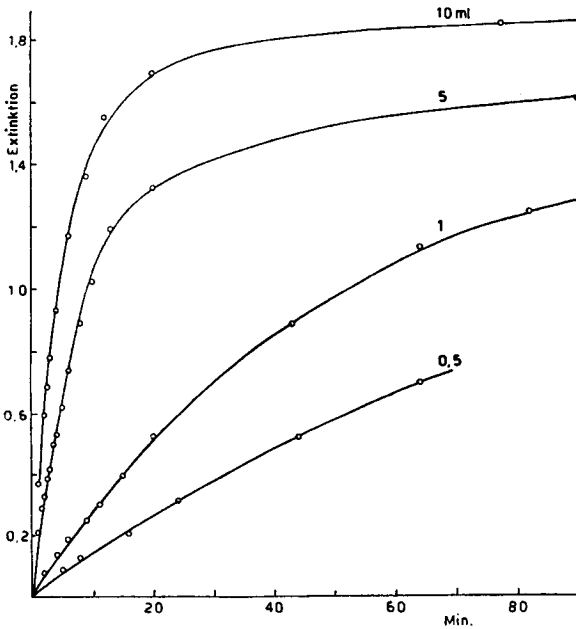


Fig. 13. Zunahme der reduzierenden Gruppen (Sumner-Zuckerbestimmungsmethode) bei der Einwirkung von *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase auf Stärke, bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.

können, welche den Verlauf des Stärkeabbaus in dieser Phase charakterisiert. Es wurde bei diesen Untersuchungen darauf verzichtet, die gemessenen Extinktionswerte, so wie es üblich ist, in Maltosewerte umzurechnen, da wir es mit einem Zuckergemisch zu tun haben. Solche Umrechnungen tragen keineswegs dazu bei, die Enzymreaktionen besser kennen zu lernen; sie geben meistens nur ein falsches Bild der Tatsachen wieder.

Bei 6 verschiedenen Enzymkonzentrationen wurde der Stärkeabbau bis zu etwa 40% des maximal möglichen Abbaus (gemessen am Extinktionswert) verfolgt und in Fig. 14 und 15 graphisch dargestellt.

Versuchsbedingungen:

Enzymlösung: Extrakt aus einer Kleiekultur (*Aspergillus flavus-oryzae*, II) mit 5 g Kleie/Kolben, geerntet nach 3 Tagen. Kleie mit ca. 500 ml Wasser extrahiert,

Stärkelösung: B. D. H., auf pH 5,7 gepuffert.

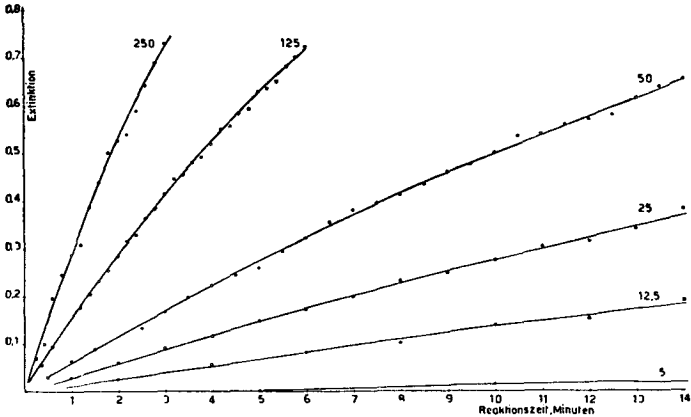


Fig. 14. Zunahme der reduzierenden Gruppen (Sumner-Zuckerbestimmungsmethode) durch Einwirkung von *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase auf Stärke, bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.

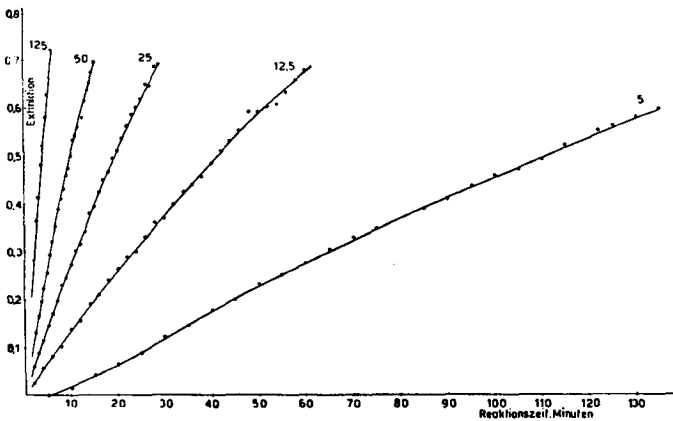


Fig. 15. Zunahme der reduzierenden Gruppen (Sumner-Zuckerbestimmungsmethode) durch Einwirkung von *Aspergillus flavus-oryzae*-Diastase auf Stärke, bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.

Zu 20 ml Stärkelösung Zusatz von 10 ml Enzymlösung, welche verschiedene Mengen des unverdünnten Originalextraktes enthält. Unverdünnter Extrakt willkürlich mit Aktivität 250 bezeichnet ($= \epsilon_s$, saccharogene Aktivität).

Aus den Diagrammen der Fig. 14 und 15 ist ersichtlich, dass die Zunahme der Extinktion mit der Zeit nicht ganz linear verläuft. Das Verhältnis von Extinktion zu Reaktionszeit ist nicht konstant, sondern wird mit Zunahme der Reaktionszeit, bei allen Enzymkonzentrationen, immer etwas kleiner.

Berechnung der Aktivität

Der nächste Schritt der Untersuchung galt der Feststellung, nach welcher Gesetzmässigkeit sich die Enzymkonzentration auf die Abbaukurven auswirkt. Zu diesem Zweck wurden für eine Reihe von Extinktionswerten die zugehörigen Reaktionszeiten aus den Diagrammen der Fig. 14 und 15 für alle Enzymkonzentrationen durch graphische Interpolation ermittelt und in Fig. 16 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass über den

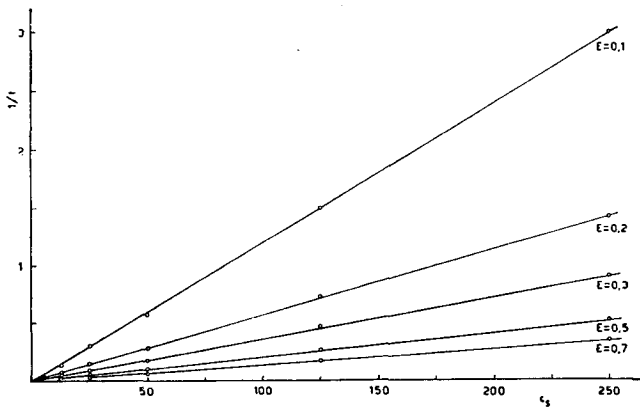


Fig. 16. Abhängigkeit des reziproken Wertes der Reaktionszeit (um die Stärke bis zu einem bestimmten Grad abzubauen) von der Enzymkonzentration, dargestellt für verschiedene Abbaugrade der Stärke.

untersuchten Bereich die für die betreffenden Extinktionswerte zugehörigen reziproken Reaktionszeiten den Enzymkonzentrationen proportional sind. Genauer kann diese Gesetzmässigkeit aus Tabelle 12 abgeleitet werden, wo das Produkt $\epsilon \times t$ bei verschiedenen Extinktionen dargestellt ist. Zwischen 250 und 25 Einheiten ist dieses Produkt für die einzelnen Extinktionswerte annähernd konstant.

Weiter kann man sich fragen, nach welcher Gesetzmässigkeit das Verhältnis von $1/t$ zu ϵ , also der Tangens der Winkel, den die Geraden gleicher Extinktionswerte mit der Abszisse bilden (Fig. 16), mit zunehmender

Extinktion abnimmt. Aus Fig. 17 ist ersichtlich, dass $1/t \times c$ proportional $1/Ext.$ ist. Es ist aber charakteristisch, dass die erhaltene Gerade nicht durch den Ursprung geht.

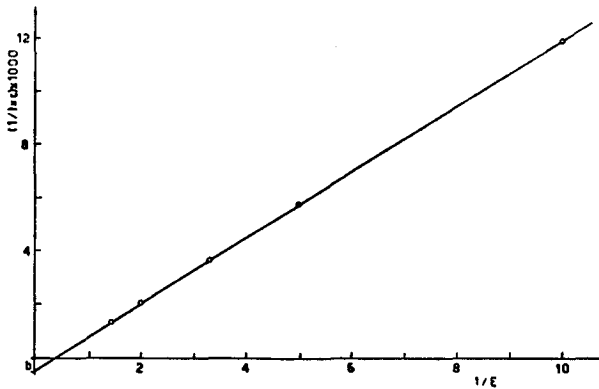


Fig. 17. Abhängigkeit des reziproken Wertes des Produktes von Reaktionszeit und Enzymkonzentration von dem erreichten Abbaugrad.

Enzymkonzentration, Reaktionszeit und Extinktion (E) stehen demnach in folgendem Zusammenhang:

$$\frac{1}{t \times c} = K \frac{1}{E} - b \quad (I)$$

wobei K die Steigung der Geraden in Fig. 17 bedeutet; b ist der in jener Figur bezeichnete Achsenabschnitt.

E = gemessener Extinktionswert.

Tabelle 12

*Bestimmung der saccharogenen Aktivität nach der Sumner-Zuckerbestimmungsmethode
Darstellung des Produktes $c \times t$ für verschiedene Extinktionswerte*

Ex- tinktion	Enzymkonzentration (c_s)					
	250	125	50	25	12,5	5
0,1	83	77	87	81	100	135
0,2	175	169	175	175	194	225
0,3	265	262	275	272	294	325
0,4	362	362	375	350	400	435
0,5	465	475	500	480	525	550
0,6	587	594	625	600	645	675
0,7	713	725	740	725	787	810

Diese Gleichung lässt sich umformen zu:

$$\frac{1}{t \times c} = \frac{K - b \times E}{E} \text{ oder}$$

$$\frac{E}{t \times c} = K - b \times E \text{ oder} \quad (\text{II})$$

$$K = E \left(\frac{1}{t \times c} + b \right) \quad (\text{III})$$

Man kann Gleichung (I) auch nach c auflösen:

$$c = \frac{1}{t \left(\frac{K}{E} - b \right)} \quad (\text{IV})$$

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich die Konstanten K und b berechnen. Sind diese bekannt, dann lässt sich die Aktivität unbekannter Enzymlösungen an Hand Gleichung (IV) bestimmen.

Die K - und b -Werte wurden aus nahezu 30 Messungen (vgl. Fig. 14 und 15) für jede Enzymkonzentration berechnet (nach Gleichung III) und ergaben die in Tabelle 13 dargestellten Resultate. Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, dass für Enzymkonzentrationen von $c_s = 250$ bis $c_s = 25$ die Werte für K und b annähernd konstant sind. Unterhalb der Aktivität 25 nehmen K - und b -Werte langsam ab.

Tabelle 13

*Bestimmung der saccharogenen Aktivität nach der Sumner-Methode
Darstellung der K - und b -Werte für verschiedene Enzymkonzentrationen*

c_s	K	b
250	0,001300	0,000488
125	0,001266	0,000436
50	0,001230	0,000467
25	0,001240	0,000412
12,5	0,001121	0,000325
5	0,000959	0,000130

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde das Mittel der vier ersten K - und b -Werte zur Berechnung herangezogen. Die Formel für die Aktivitätsberechnung lautet dann:

$$c_s = \frac{1}{t \left(\frac{0,00126}{E} - 0,000451 \right)}$$

t = Reaktionszeit in Minuten

E = der mit Hilfe der Sumner-Methode gemessene Extinktionswert bei 540 m μ und mit 10 mm Küvette

Bei Aktivitäten grösser als 250 ist es vorteilhaft, die Enzymlösungen zu verdünnen, da die Reaktionszeiten bis zur Erreichung des 40%igen Abbaus zu kurz werden und die Genauigkeit der Analyse darunter leidet, wenn auch der Stärkeabbau bei diesen Konzentrationen nach den gleichen Gesetzmässigkeiten erfolgt (innerhalb der Streuung der Analyse), wie es in späteren Untersuchungen mehrmals bestätigt wurde. Enzymaktivitäten unter 25 Einheiten mussten in der Folge selten bestimmt werden; in diesen Fällen genügte eine approximative Berechnung durch Anwendung der Konstanten für $c_s = 12,5$ bzw. für $c_s = 5$.

Um die zeitraubende Berechnung zu umgehen, kann die Aktivität unter Zuhilfenahme graphischer Methoden auf einfacherem Wege ermittelt werden. Zu diesem Zweck entnimmt man aus Fig. 18, welche die graphische Darstellung von Tabelle 12 ist, die $t \times c$ -Werte, welche den gemessenen Extinktionen entsprechen. Da t auch bekannt ist, lässt sich c_s durch eine einzige Division berechnen.

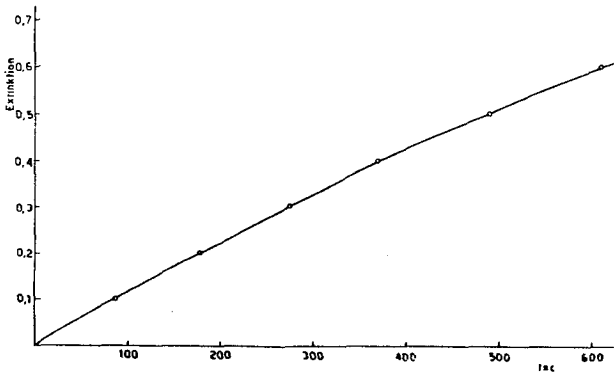


Fig. 18. Abhängigkeit des Produktes von Reaktionszeit und Enzymkonzentration von dem erreichten Abbaugrad.

An Hand der angegebenen Formeln kann man jeden beliebigen Zwischenwert (von $c_s = 250$ bis $c_s = 25$) berechnen. Genügend viele Linien konstanten c_s -Wertes, in einem Extinktion-Zeit-Diagramm aufgetragen (so wie in Fig. 19), erlauben die sofortige graphische Ermittlung der Enzymaktivität unbekannter Lösungen.

Die Aktivitätsbestimmung an Hand der Messung freigesetzter reduzierender Gruppen aus Stärke wurde mit den bisherigen Methoden in der Weise durchgeführt, dass die Enzymlösung so stark verdünnt wurde, dass innerhalb einer gut messbaren Zeit (z. B. 3 Minuten) der Abbau nicht über 10% hinausging (11). Innerhalb dieses Bereiches ist die Zunahme der Extinktion mit der Zeit annähernd linear. Es ist $K = \frac{E}{c \times t}$. Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, dass die Konstante K bis zu einem

Abbau von 40% die Formel $K = \frac{E}{c \times t} + E \times b$ annimmt; d.h. die Zunahme der Extinktion mit der Zeit nimmt stetig um einen der Extinktion proportionalen Betrag ab, nämlich $E \times b$.

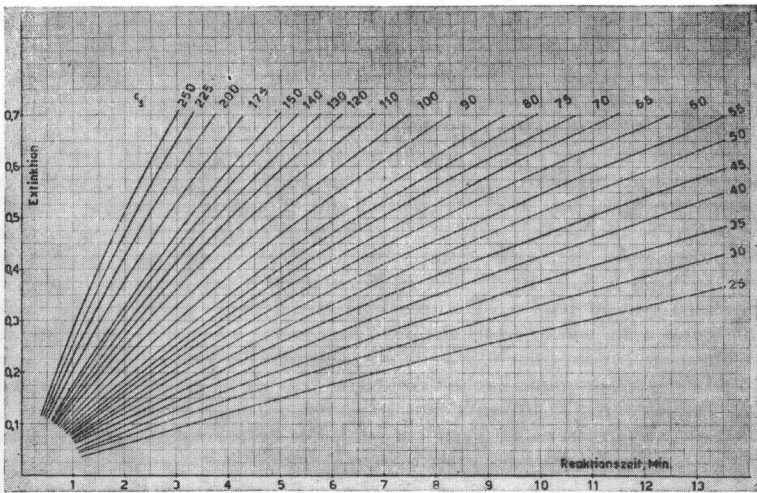


Fig. 19. Diagramm zur graphischen Ermittlung der saccharogenen Aktivität.

Es ist unbedingt von Vorteil, wenn man für die Aktivitätsbestimmung einen möglichst grossen Teil der Abbaukurve heranziehen kann. Es ist unmöglich, einen Anhaltspunkt über den Mechanismus der Stärkehydrolyse zu erhalten, wenn man nur die Phase bis zu etwa 10% Abbau berücksichtigt. Innerhalb dieses Bereiches geben z. B. α - und β -Amylasen eine mit der Zeit proportionale Zunahme der Extinktion (11). Da man damit rechnen muss, dass die proportionale Zusammensetzung der verschiedenen im Extrakt von *Aspergillus flavus-oryzae* vorhandenen Enzyme unter bestimmten Kulturbedingungen variiert, ist es von Vorteil, den Stärkeabbau möglichst bis in die letzten Phasen verfolgen zu können, um eine Verschiebung in der relativen Enzymzusammensetzung eher erkennen zu können. Mit der hier angegebenen Methode sollte das besser möglich sein als bis anhin.

Selbstverständlich kann diese Methode nur angewandt werden, wenn der Mechanismus der zu untersuchenden Enzyme tatsächlich übereinstimmt mit der Standardenzymlösung, was man durch Entnahme mehrerer Proben bei verschiedenen Reaktionszeiten gut prüfen kann.

Es sei noch auf eine Arbeit von Bodansky (13) verwiesen, nach welcher die Aktivität eines Enzyms in irgendeinem Stadium der Reaktion gemessen werden kann. Die Methode wurde an Phosphohexoisomerase ausgearbeitet und besteht darin, die Aktivität unbekannter Enzymlösungen durch

graphische Interpolation auf einer Standardkurve zu ermitteln. Diese wird aufgestellt, indem bei verschiedenen Enzymkonzentrationen die in einer festgesetzten Zeit erzeugten Spaltprodukte gemessen und graphisch aufgetragen werden. Es ist somit Voraussetzung, dass man es immer mit Enzymlösungen, die den gleichen Reaktionsmechanismus aufweisen, zu tun hat. Die Anwesenheit von Enzymen, denen ein anderer Reaktionsmechanismus zukommt, kann nicht festgestellt werden.

Ausführungsvorschrift für die enzymatische Aktivitätsbestimmung mit Hilfe der Sumner-Zuckerbestimmungsmethode

Zu 20 ml einer auf pH 5,7 gepufferten Stärkelösung (B.D.H.) (vgl. Bestimmungsvorschrift zur dextrinogenen Aktivität, S. 15), welche in einem dickwandigen Reagensglas bei 20°C (Wasserbad mit Kontaktthermometer und Umwälzpumpe) gehalten wird, werden 10 ml Enzymlösung, ebenfalls auf 20°C temperiert, zugegeben, die Zeit abgestoppt und die Reaktionslösung sofort gemischt. Nach 1, 1½, 2, 3, 5, 7, 10, 15 und 20 Minuten wird der Reaktionslösung 1 ml entnommen und zu 1 ml 3,5-Dinitrosalizylsäure-Reagens gegeben. Die Zuckerbestimmung wird, wie in Abschnitt 2122 angegeben, ausgeführt. Die Blindwert-einstellung ist aber auf folgende Weise auszuführen: Zu 3 ml Zuckerreagens werden 1 ml Enzymlösung und 2 ml Stärkelösung gegeben; 2 ml von diesem Gemisch dienen als Nullwert. Die Enzymlösung ist zu verdünnen, sofern nach 1 Minute ein Extinktionswert grösser als 0,3 erreicht wird. Die Berechnung geschieht nach der angegebenen Formel oder auf graphischem Wege.

213. *Versuche zur Trennung von Amylasen an Ionenaustauschern*

2131. Nähere Umschreibung des Problems

Wie bereits erwähnt, ist es für die Ausarbeitung von Methoden, welche die Aktivität einzelner Amylasen in einem Gemisch erfassen, unbedingt notwendig, diese Enzyme in reiner oder gereinigter Form zu haben, damit ihre Eigenschaften geprüft werden können. Aus diesem Grunde wurde versucht, eine Fraktionierung des Enzymgemisches mit Hilfe von Ionenaustauschern vorzunehmen. Mehrere Versuche einiger Forscher über die Tauglichkeit von Austauscherharzen für die Trennung von Enzymen und andern Proteinen liessen diese Methode auch für die Anwendung auf Amylasen hoffnungsvoll erscheinen (19, 20, 21, 22, 53, 57, 64, 65).

Als Austauscher wurde vielfach der schwach saure Austauscher Amberlite-IRC-50 (53) oder Amberlite-XE-64, welcher eine sehr feinkörnige Form von IRC-50 ist, verwendet (22). Aber auch mittelstark saure Austauscher, wie phosphorylierte Zellulose (57), oder stark saure Austauscher, wie Dowex-50 (64), wurden für Trennungsversuche herangezogen. Auch basische Austauscher wurden schon verwendet (65).

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit Dowex-50 und Amberlite-XE-64 durchgeführt. Da nach Angaben aus der erwähnten Literatur nur die Oberfläche der Austauscherkügelchen zur Adsorption von Proteinen zur Verfügung steht, wurde das Harz Dowex-50 mit einem schwachen Vernetzungsgrad (1% Divinylbenzol, D.V.B.) gewählt, weil zu

erwarten ist, dass infolge der grösseren Porenweite des Netzwerkes der Harzkügelchen die Austauschkapazität für Proteine erhöht wird. Es wurde das Verhalten reiner Gersten- α -Amylase und verschiedener Enzympräparate sowie frischer Enzymextrakte von *Aspergillus flavus-oryzae* gegenüber Ionenaustauschern studiert.

2132. Technik des Arbeitens mit Ionenaustauschern

Die Austauscherharze werden vor Gebrauch durch Waschen mit Wasser, organischen Lösungsmitteln sowie Säuren und Laugen ausgiebig gereinigt (vgl. z. B. 22).

Wird mit Amberlite-XE-64 gearbeitet, so kann die Equilibrierung mit dem gewünschten Puffer nicht in der Kolonne selber geschehen, denn die Pufferkapazität dieses Austauschers ist viel zu gross, so dass man mit den maximal möglichen Durchflussgeschwindigkeiten (ca. 10 ml/h) und einem 0,2 m Na-Acetat-Puffer das Gleichgewicht nach einigen Tagen noch nicht erreicht hat, d. h. das pH des Eluates stimmt noch nicht überein mit dem pH des angewandten Puffers. Sehr gut erwies sich folgende Arbeitsweise (vgl. 22). Nachdem der Austauscher mit konz. HCl in die H-Form übergeführt worden ist, wird nach sorgfältiger Spülung mit viel Wasser das Harz auf einem Büchner-Trichter trocken gesogen. Es wird dann wieder mit 0,2 m Na-Acetat-Lösung aufgerührt. Mit Hilfe eines pH-Gerätes und Magnetrührwerks wird sodann das gewünschte pH in der Suspension durch Zugabe von konz. NaOH (pH = 6) eingestellt. Die Equilibrierung geht etwa eine Stunde. Nachher verändert sich das pH in der Suspension nur noch wenig. Auf dem Büchner-Trichter wird das Harz mit viel 0,2 m Na-Acetat-Puffer von pH 6 gewaschen. Zur Sicherheit wird der Austauscher über Nacht in diesem Puffer weiter gerührt und der pH-Wert nächsten Tags wieder geprüft. Nach dieser Arbeitsweise werden nur sehr geringe Abweichungen des pH in der Suspension von demjenigen des angewandten Puffers festgestellt.

Die Equilibrierung des Dowex-50 ist bedeutend einfacher, da dieser Austauscher über einen sehr grossen pH-Bereich keine Bevorzugung für H-Ionen aufweist, wie Amberlite-XE-64. Nach Überführung in die Na-Form kann die Gleichgewichtseinstellung mit dem gewünschten Puffer direkt an der Kolonne geschehen; nach Perkolation von einigen ml stimmt das pH des Eluates mit dem pH des angewandten Puffers (vgl. z. B. Tabelle 15) überein.

Die Herstellung der Adsorptionskolonne (Chromatographiekolonne) geschieht nach der üblichen Technik (14). Es wurden Kolonnen von 1 cm innerem Durchmesser verwendet; die Höhe ist jeweils angegeben.

2133. Versuche mit reiner Gersten- α -Amylase an Dowex-50 (1% D.V.B.)

Einige Versuche wurden mit reiner α -Amylase aus Gerste durchgeführt, um eine bessere Übersicht über das Verhalten von Enzymen gegenüber Ionenaustauschern zu gewinnen. Dabei wurde der stark saure Austauscher

Dowex-50 gewählt, weil hier die Verhältnisse etwas einfacher erschienen als z. B. bei den schwach sauren Austauschern, wo im schwach sauren pH-Bereich starke Adsorption der Proteine nicht nur durch Ionenaustausch, sondern auch durch van der Waal'sche Kräfte stattfindet. Aus einigen Vorversuchen war bald ersichtlich, dass die Austauschkapazität von Dowex-50 für die Gersten- α -Amylase sehr gering ist. Es wurde deshalb nur mit Mengen von 0,5 bis 1 mg Enzym pro Kolonne gearbeitet.

In einem ersten Versuch wurde die Inaktivierung der α -Amylase studiert. Dabei konnte das Enzym bei pH 4,8 am Austauscher zu ca. 96% adsorbiert und durch pH-Steigerung des Elutionsmittels auf 6,6 wieder eluiert werden. Bei einem Austauscher, der mit einem Puffer von pH 6 equilibriert ist, wird die α -Amylase bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 15 ml/Stunde und 20 cm Kolonnenhöhe nicht adsorbiert, wie aus Tabelle 14 hervorgeht. Es ist ebenfalls ersichtlich, dass bei Kontaktzeiten von 1 bis 2 Stunden bei pH 4,8 und Zimmertemperatur starke Inaktivierung des Enzyms stattfindet. Von 96% der am Austauscher adsorbierten Aktivität kann nur etwa 4% durch pH-Erhöhung zurückgewonnen werden. Eine Kontaktzeit von 16 Stunden bewirkt vollständige Inaktivierung des zurückgehaltenen Enzyms. Bei 0°C hingegen ist die Inaktivierung viel weniger intensiv. Von 97% des adsorbierten Enzyms können immerhin 76% wiedergewonnen werden.

Tabelle 14

Einfluss der Kontaktzeit und der Temperatur auf die Inaktivierung von Gersten- α -Amylase durch Dowex-50 bei pH 4,8

Kolonnendimensionen: 1 \times 25 cm,

Puffer: pH 4,8, Na-Acetat ([Na] = 0,2 m),
pH 6,6, Na-Phosphat ([Na] = 0,2 m),

Elutionsgeschwindigkeit: 15 ml/h,

Enzymlösung: 1 mg Gersten- α -Amylase (Mann) in 0,5 ml Puffer,

Aktivitätsprüfung: 10 ml von der perkolierten bzw. unbehandelten Enzymlösung (0,5 ml auf 15 ml verdünnt) zu 20 ml Amyloselösung gegeben. Temp. = 20°C. Verfolgung des Amyloseabbaus durch spektrophotometrische Bestimmung der Jod-Amylose-Färbung.

Temperatur	20°C						0°C		
	6,6	4,8	6,6	4,8	6,6	4,8	6,6	4,8	6,6
pH	6,6	4,8	6,6	4,8	6,6	4,8	6,6	4,8	6,6
Kontaktzeit h	1	1	1	2	1	16	1	1	1
Eluat ml	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Zurückgewonnene Aktivität %	100	3,5	3,5	4,2	4,5	3,5	0	3	76

Es sei noch bemerkt, dass die Enzymlösung, welche als Bezugsprobe diente, abgesehen von der Perkolation durch den Austauscher, wirklich genau den gleichen Temperatur- und pH-Bedingungen unterzogen wurde, wie die zu prüfende Lösung, so dass etwaliche Inaktivierungserscheinungen, welche nicht auf die Wirkung des Austauschers zurückzuführen sind, berücksichtigt werden. Der Schwund der Aktivität im Eluat ist auch nicht etwa darauf zurückzuführen, dass unvollständige Elution stattgefunden hat; mit 15 ml Eluat kann das bei pH 4,8 adsorbierte Enzym durch Wechsel des pH des Elutionsmittels zu 6,6 in der Tat vollständig eluiert werden, denn bei weiterer Elution kann keine Aktivität mehr festgestellt werden; die pH-Änderung geht an diesem Austauscher rasch vor sich, wie es Tabelle 15 zeigt.

Tabelle 15

Pufferkapazität von Dowex-50 (1% D.V.B.)
 (Bestimmung der Elutionsmenge bei pH-Wechsel,
 um im Eluat das gewünschte pH zu erreichen)

Kolonnenabmessungen: 1 × 25 cm,

Puffer: pH 4,8, Na-Acetat ([Na] = 0,2 m) zur Equilibrierung mit dem Austauscher, dann Wechsel zu
 pH 6,6, Na-Phosphat ([Na] = 0,2 m),

Perkolationsgeschwindigkeit: 8—12 ml/h,

Temp. = 20° C.

Fraktion No	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eluat ml	1,8	1,8	1,2	0,8	0,7	0,8	3	3,5	3,5
pH	4,81	4,81	4,74	4,40	4,66	6,20	6,66	6,66	6,66

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Bedeutung des pH und der Perkulationsgeschwindigkeit des Elutionsmittels sowie der Kolonnenhöhe untersucht. Wie Tabelle 16 zeigt, muss bei einer Kolonnenhöhe von 25 cm und einer Perkulationsgeschwindigkeit von 30 bis 34 ml/h das pH des Elutionsmittels bis auf 4,8 gesenkt werden, damit eine Adsorption von etwa 86% stattfindet. Durch Erniedrigung der Perkulationsgeschwindigkeit auf 8 ml/h findet bei pH 4,8 praktisch 100%ige Adsorption statt, und bei pH 5,2 werden 14% der Aktivität zurückbehalten. Bei diesem pH lassen sich auch etwa 50% des Enzyms adsorbieren, wenn die Elutionsgeschwindigkeit auf 1,5 ml/h heruntersetzt wird. Eine Durchflussgeschwindigkeit der gleichen Grössenordnung (1 ml/h) erlaubt praktisch vollständige Adsorption bei demselben pH, wenn eine Kolonne der Höhe 60 cm angewendet wird; es wird dann sogar bei pH 6,0 ein grosser Teil (35%) der Aktivität zurückbehalten.

Tabelle 16

Einfluss von pH, Durchflusgeschwindigkeit (V) und Kolonnenhöhe (H) auf die Adsorption von Gersten- α -Amylase an Dowex-50 (1% D.V.B.)

Temp. = 0°C

H in cm

V in ml pro Stunde

Fraktion No	H = 25										H = 60			
	V = 30-34		V = 8		V = 1,5		V = 1		V = 0,6 -1,5		ml Eluat	c % Eluat		
	pH = 6,2	pH = 5,6	pH = 5,2	pH = 4,8	pH = 4,8	pH = 5,2	pH = 4,8	pH = 5,2	pH = 5,2	pH = 6,0				
1	2,0	0	2,4	0	2,4	0	2,1	0	1,1	0	12	0	14	0
2	2,4	3,62	1,8	0	2,0	0	2,0	0	1,0	0	2	0,1	1,8	5,6
3	2,4	96,10	1,9	95,2	2,4	90	2,0	61,2	1,5	0	2	0,2	1,9	39,4
4	2,3	2,07	2,3	14,0	2,0	11,2	2,2	ca.3	1,8	<1	2	0,2	1,9	12,2
5	2,3	0,48	2,0	0,7	2,2	1,67	2,0	2,7	1,7	≪1	2	0,1	1,9	4,25
6	-	-	1,9	<0,7	-	-	2,0	3,05	-	-	2	<0,1	2,0	1,29
7	-	-	-	-	-	-	2,0	1,04	-	-	2	0	2,0	0,80
8	-	-	-	-	-	-	2,0	0,80	-	-	2	0	2,0	0,65
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	0,55
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	0,35
Total	11,4	102	12,3	110	10,7	103	16,1	86	8,7	≤1	10,9	51,8	31,9	65,1

2134. Trennungsversuche mit Diastase-Präparaten und frischen Enzymextrakten von *Aspergillus flavus-oryzae*

Diese Versuche wurden zum Teil schon vor den im vorhergehenden Abschnitt (2133) beschriebenen Versuchen begonnen, weshalb diese Ergebnisse nicht von Anfang an für die Trennung von Enzymgemischen angewendet werden konnten.

a) *Versuche an Dowex-50*

Ausgehend von ziemlich tiefen pH-Werten wurde versucht, durch wiederholte Erhöhung des pH des Eluiermittels eine Fraktionierung des Enzymgemisches zu erreichen. Man hätte erwarten können, dass gewisse Amylase-Komponenten bei tiefem pH am Austauscher festgehalten und dann durch pH-Erhöhung wieder eluiert würden. In der Tat wurde bei dem Handelspräparat Clarase auf diese Art und Weise wiederholt folgende Fraktionierung erreicht:

1. Fraktion bei pH 4,8
2. Fraktion bei pH 6,6
3. Fraktion bei pH 8,0

Versuchsbedingungen:

Enzymlösung: 10 mg Clarase in 1 ml Puffer,

Kolonnendimensionen: 1 × 20 cm,

Perkolationsgeschwindigkeit: 12 bis 60 ml/h,

Pufferlösungen: pH 4,8, Na-Acetat,

pH 6,6 und 8,0, Na-Phosphat,

[Na] für jeden Fraktionierungsversuch konstant, variierte aber von Versuch zu Versuch von 0,01 zu 0,05 bis zu 0,2 m.

Temperatur = 20°C.

Aktivitätsprüfung: qualitativ, durch Zugabe von verdünnter Amyloselösung zum Eluat, das in Mengen von 1–2 ml aufgefangen wurde.

Bei pH-Werten von 8 im Eluat wurde die Reaktion durch Pufferzugabe auf 4,8–6 gestellt. Bei jedem pH-Wechsel wurde so lange eluiert, bis keine Aktivität mehr festzustellen war.

Diese Fraktionen enthalten aber keine reinen Komponenten, was gezeigt werden konnte, indem diese wieder den gleichen Bedingungen wie das ursprüngliche Präparat unterworfen wurden. Es wurde die bei pH 4,8 austretende Fraktion wieder bei pH 4,8 durch einen regenerierten Austauscher perkoliert, und anschliessend wurde geprüft, ob wieder ein Teil der Aktivität zurückbehalten worden war, indem das pH auf 6,6 erhöht wurde. Dabei konnte in der Tat wieder schwache Aktivität festgestellt werden. Die bei pH 6,6 eluierbare Fraktion wurde wieder bei pH 4,8 durch einen regenerierten Austauscher perkoliert, wobei auch bei diesem pH wieder Aktivität nachweisbar war. Durch anschliessende Erhöhung des pH auf 6,6 konnte dann nochmals eine aktive Fraktion gewonnen werden.

Es zeigte sich aber, dass die bei pH 8,0 eluierbare Fraktion von einer Komponente begleitet ist, welche in den vorhergehenden Fraktionen nicht vorhanden ist. Diese Komponente ist nämlich jodunempfindlich. Während bei den andern Fraktionen durch Zugabe von Jod die Aktivität vollständig sistiert wird, kann dieses Enzym die Amylose trotz Jodanwesenheit im Verlauf mehrerer Stunden weitgehend abbauen.

Die Unreinheit der Komponenten wird wohl vor allem auf Übersättigung des Austauschers mit Proteinen zurückzuführen sein, ist doch die Kapazität, wie aus den Versuchen mit α -Amylase ersichtlich ist, sehr klein. Erst durch systematische Variation der die Trennung beeinflussenden Faktoren könnte unter Anwendung sehr kleiner Enzymmengen abgeklärt werden, ob eine Aufteilung in verschiedene reine Komponenten möglich ist. Diese Versuche sind aber bei sehr kleinen Enzymmengen äusserst heikel. Deshalb wurden vorerst noch Versuche an XE-64 ausgeführt.

b) *Versuche an Amberlite-XE-64*

Diesem Austauscher wird eine höhere Kapazität für Proteine nachgesagt (22). Es können allerdings keine Fraktionierungen analog den vorhergehenden Versuchen, durch pH-Erhöhung, durchgeführt werden, weil die Pufferkapazität von Amberlite-XE-64 in dem für die Trennung günstigen pH-Bereich von 4,5 bis 7 zu gross ist. Der Austauscher ist nicht wie im Falle von Dowex-50 bei pH-Werten unter 7 zum grössten Teil in der Salzform, sondern die Carboxylgruppen des Austauschers sind je nach pH weitgehend durch H-Ionen abgesättigt. Es war in der Tat nicht möglich, bei einer Kolonne von den Dimensionen 1×25 cm, bei Anwendung eines Phosphatpuffers von pH 7,0 ($[Na] = 0,2$ m) und einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/h, das pH im Eluat auf 7 zu erhöhen, wenn der Austauscher vorher mit einem Puffer von pH 6 ins Gleichgewicht gestellt worden war. Die grosse Menge Eluat, die notwendig ist, bedingt natürlich lange Kontaktzeiten am Austauscher, was zu Inaktivierungen führt.

Die Untersuchungen an Amberlite-XE-64 sind eher Chromatographie-Versuche. Es wurde geprüft, ob bei einem pH von 6,0 eine Trennung der Amylasen möglich ist, und zwar auf Grund verschiedener Wanderungsgeschwindigkeiten dieser Enzyme. Von verschiedenen Autoren konnte auf diese Weise eine sehr gute Fraktionierung von Eiweisskomponenten erreicht werden (19, 20, 21, 22, 53). In Tabelle 17 sind einige Trennungsversuche dargestellt.

Aus Tabelle 17 ist ersichtlich, dass von beiden Enzymlösungen ca. 7 bis 13% der Aktivität, gemessen an der dextrinisierenden Wirkung, zurückbehalten oder inaktiviert werden. Die bei allen Enzymlösungen festgestellte zweite und dritte Komponente können diesen Verlust nicht aufwägen, denn ihre Aktivität macht nur 10^{-3} bis 10^{-4} % der Gesamtkapazität aus, wenn auch eine deutliche Abtrennung dieser Komponenten festgestellt wurde. Ob es sich in diesem Fall wirklich um verschiedene und reine Komponenten handelt, wurde nicht näher verfolgt. Ihre sehr geringe Aktivität erschwert das Studium beträchtlich.

Tabelle 17

Trennungsversuche an Amberlite-XE-64. Fraktionierung des Eluates

Enzymlösungen: 1 ml Enzymextrakt einer 3tägigen *Aspergillus flavus-oryzae*-Kultur, Stamm II, auf Kleie gezüchtet bei 25° C,
bzw. 5 mg Enzympräparat in 1 ml Puffer gelöst,
Puffer (Elutionsmittel): Na-Acetat, [Na] = 0,2 m, pH 6,0,
Temp. = 0° C,
Kolonnendurchmesser: 1 cm,
Grösse der Fraktionen: 1 bis 2 ml,
Aktivitätsprüfung: spektrophotometrische Methode auf Amylose.

Enzym	Kolonnenhöhe cm	Durchfluss ml/h	Aktivität im Eluat (1. Komp.)	Menge Eluat ml	ml Eluat bis 2. Komp.	3. Komp.	Eluat total ml
<i>A. flavus-oryzae</i>	60	2	85,5	20	37,5	46	72
Clarase	40	2	93,5	21	67	102	150
Clarase	65	4	87,8	39	88	377	423

Tabelle 18

Versuche mit Amberlite-XE-64. Quantitative Bestimmung der diastatischen Aktivität im nicht fraktionierten Eluat

Versuchsbedingungen siehe Tabelle 17

Enzym	Kolonnenhöhe cm	Durchfluss ml/h	Eluat ml	$\%D$ %
Clarase	40	2,5—3	56	91,3
Polidase-S	65	8,5	103	88,8
Taka	65	8,5	105	89,8

In weiteren quantitativen Versuchen wurde an einigen Enzympräparaten untersucht, ob auch hier ein Teil der Aktivität durch Perkolation über den Austauscher verschwindet. Es wurde aber keine Auftrennung der Eluate in kleine Fraktionen vorgenommen, sondern es wurde eine grössere Menge Eluat (50 bis 100 ml) gesammelt und davon die Aktivität bestimmt. Wie aus Tabelle 18 ersichtlich ist, wird bei den drei untersuchten Präparaten etwa 10% der dextrinisierenden Aktivität zurückbehalten oder inaktiviert.

Die mit der spektrophotometrischen Methode ausgeführten Aktivitätsbestimmungen liessen keine Änderung im Reaktionsmechanismus der Enzymlösungen erkennen.

Der endgültige Entscheid, ob Ionenaustauscher für die Trennung von Amylasen, insbesondere der Komponenten von *Aspergillus flavus-oryzae*, brauchbar sind, lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen noch nicht fällen; es sind noch weitere Untersuchungen notwendig, welche die systematische Veränderung der Faktoren berücksichtigen, welche die Trennung beeinflussen.

22. KULTIVIERUNGSMETHODEN UND SUBSTRATAUFARBEITUNG

221. Herstellung des Kleienährbodens

3 bis 20 g feine, lufttrockene Weizenkleie werden in 200 ml-Erlenmeyerkolben abgewogen, mit der gewünschten Menge Wasser homogen befeuchtet, mit einem nicht zu festsitzenden Pfropfen aus entfetteter Watte verschlossen und 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Die Kleie vermag noch das 4fache des Eigengewichts an Wasser festzuhalten, ohne dass dabei der Charakter eines festen Nährbodens zerstört wird. Bei grossen Wasserzugaben vor der Sterilisation wirkt sich die Quellung stärker aus. Sie fällt bei Anwendung von 20 g Kleie infolge der konischen Form des Erlenmeyerkolbens am stärksten ins Gewicht.

Es wurden folgende Symbole verwendet:

M = Menge Kleie (in g) pro Kolben

W_1 = Wasserzugabe (in ml) vor der Sterilisation

W_2 = Wasserzugabe (in ml) nach der Sterilisation

Die angewandten Kleiemengen ergaben folgende Schichthöhen im Erlenmeyerkolben:

Einwaage, g(M)	Schichthöhe mm
3	3-4
5	5-7
10	11-13
20	24-26

(bei starker Quellung bis ca. 32)

222. Impfmateriale und Impftechnik

a) Bezeichnung der Kulturen

In dieser Arbeit wurden, der Einfachheit halber, alle verwendeten Stämme mit Nummern bezeichnet.

Bezeichnung	
in der Institutssammlung	in dieser Arbeit
Aspergillus oryzae (Baden)	II
Aspergillus flavus, Link	III
Aspergillus flavus, Walker	IV

b) Vorzüchtung des Impfmateriale

Für sämtliche Versuche, wo keine speziellen Angaben über das Impfmateriale gemacht sind, wurde dieses durch eine zehntägige Kultur auf Bierwürze-Schrägagar bei 25°C gewonnen. Für die ersten Versuchsserien

wurde die Vorkultur jeweils frisch angesetzt. Später wurde eine grössere Anzahl von Schrägagar-Kulturen hergestellt und nach 10 Tagen Bebrütung bei 0°C aufbewahrt. Auf diese Weise war immer Impfmateriale vorrätig, und den allfälligen Degenerationserscheinungen durch zu oft es Überimpfen sollte so etwas entgegengewirkt werden. Die bei tiefer Temperatur aufbewahrten Kulturen zeigten kein abweichendes Verhalten von denjenigen, die sofort nach der Bebrütung als Impfmateriale verwendet wurden.

c) *Herstellung der Impfsuspension*

Die Konidien des Pilzes werden unter Zuhilfenahme der Impfnadel mit 2 mal 6 bis 8 ml sterilem Wasser vom Mycel abgelöst und durch sterile Watte filtriert, um sie von den begleitenden Mycel- und Agarstückchen zu befreien. Die Zahl der Konidien wird in einer Zählkammer nach Thoma festgestellt und durch Verdünnen mit sterilem Wasser wird die Konzentration auf die gewünschte Dichte gebracht. Wo keine besonderen Angaben gemacht sind, wurde die Suspension so verdünnt, dass 10^8 Konidien pro g Kleie geimpft werden konnten.

Die mit der Zählkammer ermittelte Konidienzahl stimmte mit derjenigen der durch die „Plattenmethode“ bestimmten Keimzahl grössenordnungsmässig überein, wie es Tabelle 19 zeigt. Diese Konidien weisen somit eine gute Keimfähigkeit auf.

d) *Beimpfung des Kleienährbodens*

Da es sich bei der Kleie um einen festen Nährboden handelt, ist die möglichst homogene Verteilung der Konidien ausserordentlich wichtig. Diesem Umstand ist vor allem dann Rechnung zu tragen, wenn mit kleinen Wassergehalten der Kleie gearbeitet wird, weil diese das mit der Impfsuspension zugegebene Wasser gierig aufnimmt und lokal festhält. Die Versuchsanordnung verlangte auch oft, dass das Volumen der Impfsuspension möglichst klein sei. Um die homogene Verteilung zu erreichen, ist es notwendig, die Suspension Tropfen neben Tropfen auf die Kleie zu bringen.

Die minimale Wassermenge, welche noch eine gute Verteilung der Konidien erlaubt, macht etwa die Hälfte des Kleiegewichts aus. Dies geht aus Versuchen über den Einfluss des Wassergehaltes auf die diastatische Aktivität hervor (vgl. Fig. 23, 24 und 25). Es wurde in jenen Versuchen ein totaler Wassergehalt, welcher den 0,5- bis 4fachen Anteil der Kleie beträgt, eingestellt, und zwar durch verschiedene Kombinationen der Wasserzugabe vor und nach der Sterilisation. Wenn man von jenen Fällen absieht, wo sämtliches Wasser in Form von der Impfsuspension nach der Sterilisation zugegeben wird, kann man feststellen, dass im Durchschnitt keine besseren Ergebnisse erzielt werden, wenn eine Impfsuspension angewendet wird, welche grösser ist als die Hälfte des Kleiegewichts.

Tabelle 19

Prüfung von 2 Keimzahlbestimmungsmethoden

Stamm	Zahl der Parallelen	Agar-Agar-Nährboden	Plattengussverfahren		Zählkammer	
			Verdünnung 10 ⁴	Verdünnung 10 ⁵	Durchschnitt unverdünnt	Durchschnitt unverdünnt
II	3	Bierwürze	167	30	2,3 × 10 ⁶	10 ⁶
		Bierwürze	137	19	1,6 × 10 ⁶	
II	3	Bierwürze	—	40	4 × 10 ⁶	10 ⁶
		Stärke	—	45	4,5 × 10 ⁶	
II	3	Bierwürze	—	61	6,1 × 10 ⁶	10 ⁶
		Stärke	—	65	6,5 × 10 ⁶	
II	2	Bierwürze	355	55	4,5 × 10 ⁶	10 ⁶
III	2	Bierwürze	58	10	0,8 × 10 ⁶	10 ⁶
IV	2	Bierwürze	74	8	0,8 × 10 ⁶	10 ⁶

Angaben in der Tabelle in Anzahl Keime/ml

Zählkammermethode: Durchschnitt aus 40 Auszählungen

223. Aufarbeitung des Substrates

a) Herstellung des Enzymextraktes

Um einen reproduzierbaren Extrakt aus der Kleie gewinnen zu können, ist deren möglichst homogene Verteilung in Wasser notwendig. Der Kleiekuchen, welcher durch das Mycel sehr kompakt wird, muss mit einem dicken abgerundeten Glasstab im Erlenmeyerkolben zerstoßen und unter Zusatz von Wasser zu einem Brei angerührt werden. Es wird dann noch soviel Wasser zugesetzt, dass die überstehende Flüssigkeit im Kolben ca. 1,5 cm beträgt. Nach der pH-Messung wird, unter Zuhilfenahme von Trichter und weithalsigem Messkolben, mit Wasser auf das 50fache Volumen (in ml) des angewandten Kleiegewichts (in g) aufgefüllt. Die Suspension wird in eine Flüssigkeitsflasche in der Weise umgeleert, dass die Kleiestückchen möglichst quantitativ übergespült werden. Es wird während einer Stunde geschüttelt. Anschliessend wird die diastatische Aktivität bestimmt, sobald sich die Kleieteilchen abgesetzt haben.

b) Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration

Zu diesem Zweck stand ein pH-Gerät (Polymetron) mit Glaselektrode und Kalomelektrode zur Verfügung.

c) Bestimmung der diastatischen Aktivität

Das Dextrinisierungsvermögen wurde nach der abgeänderten Wohlgemuth-Methode bestimmt, und zwar bei 20° C, unter Anwendung einer auf pH 5,7 gepufferten Stärkelösung (B. D. H.) und Farbstandard II. Sämtliche

Angaben der dextrinogenen Aktivität (c_d) beziehen sich auf 10 ml des unverdünnten Enzymextraktes. Die saccharogene Aktivität (c_s) wurde ebenfalls nach der schon beschriebenen Methode unter Anwendung der gleichen Stärkelösung wie für die Bestimmung der dextrinogenen Aktivität bestimmt. Auch hier beziehen sich alle Messungen auf 10 ml des unverdünnten Enzymextrakts.

3. Prüfung einiger *Aspergillus flavus-oryzae*-Stämme auf die Bildung dextrinisierender Enzyme

Es wurden drei am hiesigen Institut vorhandene Stämme geprüft. Der Versuch wurde auf Kleie unter den in der Tabelle 20 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 20

Bildung dextrinisierender Enzyme durch 3 Aspergillus flavus-oryzae-Stämme

Temp. = 25°C $M = 10 \text{ g}$ $W_1 = W_2 = 10 \text{ ml}$

Zeit h	Stamm II		Stamm III		Stamm IV	
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
43	6,11	445	5,78	22	6,15	17
70	6,50	572	6,40	44	6,14	26
93	7,32	572	7,07	43	7,03	26
114	7,60	572	7,34	44	7,38	24
162	8,09	554	7,89	45	7,86	29
240	8,32	540	8,52	41	8,44	27
600	8,25	547	8,22	46	8,61	27

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Es ist ersichtlich, dass das Maximum der dextrinogenen Aktivität bei allen 3 Stämmen nach etwa 70 Stunden erreicht ist. Die Aktivität sinkt bei längerer Kulturzeit praktisch nicht. Gelegentliche kleine Überschreitungen der Aktivität nach 70 Stunden liegen im Bereich des Versuchsfehlers. Von den drei Stämmen ist II der aktivste. Dieser wurde für die weiteren Untersuchungen herangezogen.

4. Einige Faktoren, welche die diastatische Aktivität in Kulturen von *Aspergillus flavus-oryzae* beeinflussen

41. WECHSELWIRKUNG VON BEBRÜTUNGSTEMPERATUR, WASSERGEHALT UND SCHICHTHÖHE DER KLEIE AUF DIE BILDUNG DEXTRINOGENER ENZYME

411. Vorversuch: Einfluss der Temperatur bei 2 Schichtböden

Aus Tabelle 21 und Fig. 20 ist ersichtlich, dass die Temperatur sowohl die maximale Ausbeute, als auch die dazu notwendige Bebrütungszeit beeinflusst. Auch die Schichthöhe wirkt sich bei ändernder Temperatur verschieden aus. So beträgt bei der kleinen Schichthöhe das Maximum der

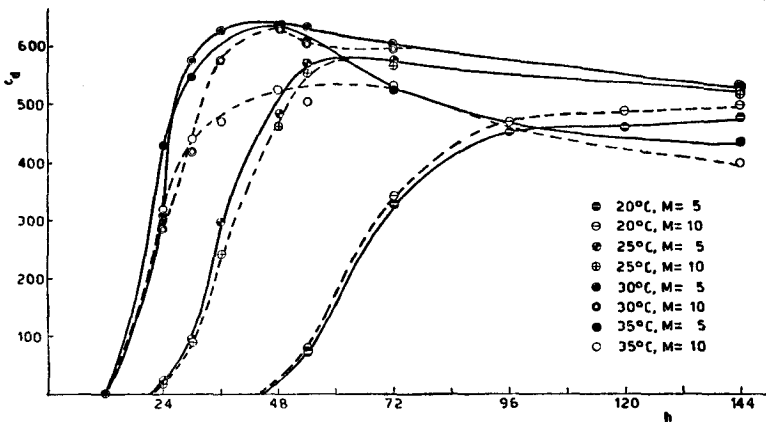


Fig. 20. Einfluss der Temperatur auf den Zeitverlauf der Bildung dextrinisierender Enzyme durch *Aspergillus flavus-oryzae* auf Kleie bei zwei Schichthöhen.

dextrinogenen Aktivität bei 20°C rund 480 Einheiten nach ungefähr 144 Stunden, bei 25°C rund 570 Einheiten nach etwa 54 Stunden und bei 30°C und 35°C etwa 630 Einheiten nach ungefähr 36 bis 48 Stunden. Bei 20°C, 25°C und 30°C hat die Schichthöhe (in diesem Bereich) keinen bedeutenden Einfluss. Die Ausbeute an Diastase wird aber merklich beeinträchtigt durch Erhöhung der Schichthöhe bei 35°C, indem die maximale Aktivität bei $M=10$ nur 525 Einheiten beträgt, während sie bei $M=5$ auf etwa 630 Einheiten ansteigt. Die Temperatur äussert sich auch in ihrem

Tabelle 21

Einfluss der Temperatur auf die Bildung dextrinisierender Enzyme

20°C							25°C						
5 g Kleie				10 g Kleie			5 g Kleie				10 g Kleie		
Zeit h	pH	c_d	\bar{c}_d	pH	c_d	\bar{c}_d	Zeit h	pH	c_d	\bar{c}_d	pH	c_d	\bar{c}_d
54	6,34	66	72	6,34	71	77	24	6,28	23	23	6,16	20	20
	6,30	77		6,30	83			6,25	23		6,20	21	
72	6,42	333	329	6,32	344	344	30	6,31	87	91	6,33	95	95
	6,38	325		6,37	340			6,32	95		—	—	
96	6,50	462	453	6,45	480	471	36	6,35	300	297	6,32	293	242
	6,45	445		6,46	462			6,32	286		6,26	190	
120	6,33	462	462	6,45	480	490	48	6,53	415	482	6,26	463	463
	6,36	462		6,51	500			6,35	548		6,28	463	
144	6,64	480	480	6,78	500	500	54	6,38	570	570	6,29	572	554
	6,58	480		6,72	500			6,35	570		6,23	547	
216	7,75	480	480	8,13	500	500	72	6,55	570	570	6,52	570	570
	7,80	480		7,74	500			6,63	570		6,52	570	
							144	8,20	524	524	8,14	524	524
								8,15	524		8,08	524	
30°C							35°C						
5 g Kleie				10 g Kleie			5 g Kleie				10 g Kleie		
Zeit h	pH	c_d	\bar{c}_d	pH	c_d	\bar{c}_d	Zeit h	pH	c_d	\bar{c}_d	pH	c_d	\bar{c}_d
12	6,28	1,5	1,5	6,20	2	2	12	6,25	5	5	6,15	6	6
	6,29	—		6,14	2			6,24	5		6,18	6	
24	6,26	310	310	6,19	285	285	24	6,44	428	428	6,37	325	320
	6,29	310		6,24	285			6,52	428		6,31	316	
30	6,46	572	572	6,56	408	418	30	6,47	572	547	6,53	415	439
	6,43	572		6,44	428			6,47	522		6,65	463	
36	6,32	605	628	6,39	572	572	36	6,26	572	572	6,58	462	471
	6,38	632		6,37	572			6,26	572		6,57	480	
48	6,53	632	632	6,37	632	632	48	6,84	632	632	6,44	525	525
	6,55	632		6,36	632			6,70	632		6,50	525	
54	6,90	632	632	6,58	602	602	54	7,10	602	602	6,72	500	500
	7,16	632		6,56	602			7,11	602		6,71	500	
72	7,50	602	602	7,22	602	602	72	7,82	522	522	7,44	525	525
	7,68	602		7,21	602			7,92	522		7,57	525	
144	8,20	522	534	8,33	522	534	144	8,29	445	436	8,54	400	400
	8,26	546		8,37	546			8,25	428		8,58	400	

Einfluss auf die Stabilität der dextrinogenen Aktivität. Während bei 20°C keine Verminderung der enzymatischen Aktivität nach 216 Stunden Bebrütungszeit festgestellt wurde, wird bei erhöhter Temperatur, insbesondere bei 35°C, die Instabilität der Diastase sehr augenfällig.

Es ist ebenfalls ersichtlich, dass die Übereinstimmung der Parallelen ziemlich gut ist. In den nächsten Versuchen wurde nur der Mittelwert der beiden Parallelen angegeben.

Als Kontrolle auf die physiologische Aktivität des Pilzes wurde in den folgenden Experimenten meistens einer von den eben aufgeführten Versuchen zum Vergleich wiederholt.

412. Nähere Umschreibung des Problems und Versuchsübersicht

Aus dem vorhergehenden Versuch ist ersichtlich, dass eine gewisse Wechselwirkung zwischen Temperatur und Schichthöhe besteht. Aus Angaben aus der Literatur geht hervor, dass Temperatur und Wassergehalt der Kleie voneinander abhängige Faktoren sind (70). Demnach ist eine Wechselwirkung zwischen den drei Faktoren Wassergehalt, Schichthöhe und Temperatur zu erwarten. Der Faktor Wassergehalt wurde in zwei Variablen aufgeteilt, nämlich: 1. Wassermenge, welche vor dem Sterilisieren zugegeben wird (W_1), 2. Wassermenge, die mit der Impfsuspension zugeführt wird (W_2). In den ersten Versuchen wurden diese beiden Variablen näher untersucht, indem sie einer systematischen Veränderung über mehrere Stufen unterzogen wurden. In weiteren Versuchen wurden nur noch die beiden folgenden extremen Fälle untersucht: 1. die gewünschte totale Wassermenge wird erst mit der Impfsuspension beigegeben, 2. bestimmte Wasserzugaben vor der Sterilisation werden mit einer konstanten, minimal grossen Impfmenge auf denselben totalen Wassergehalt (wie bei 1) eingestellt. Dieses Vorgehen wurde gerechtfertigt durch die Untersuchungen, aus denen hervorging, dass es zur Hauptsache nur auf den totalen Wassergehalt ankommt, mit Ausnahme der Fälle, wo sämtliches Wasser nach der Sterilisation in Form von der Impfsuspension zugegeben wird.

Bei 25°C und 10 g Kleie pro Kolben wurde der Einfluss des Wassergehaltes in verschiedenen Kombinationen genau studiert, indem Wasserzugabe vor und nach der Sterilisation systematisch kombiniert wurden. Es wurden die aus dem eingerahmten Viereck des Schemas 1 ersichtlichen Kombinationen gewählt. Es wurden demnach die Wasserzugaben vor der Sterilisation: 0, 5, 10 und 15 ml kombiniert mit 5, 10, 15 und 20 ml Wasserzugabe nach der Sterilisation. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 22a dargestellt. Da es, wie aus Schema 1 ersichtlich ist, noch weitere Kombinationsmöglichkeiten gibt, bis die maximal mögliche Wasserzugabe erreicht wird (40 ml), wurden in einem weiteren Versuch auch noch jene im Schema ausserhalb des eingerahmten Vierecks aufgeführten Kombinationen durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuches gibt Tabelle 22b wieder. Da die Reproduzierbarkeit der Kontrollen genügend gut ist,

Schema 1

Darstellung der gewählten Kombinationen der Wasserzugabe vor und nach der Sterilisation, um den gewünschten totalen Wassergehalt einzustellen

<u>H₂O vor der Sterilisation</u>	<u>H₂O total</u>									
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
	<u>H₂O nach der Sterilisation</u>									
0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0				
0,5	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,5				
1,0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0					
1,5	0,5	1,0	1,5	2,0						
2,0		1,0	2,0							
2,5	0,5		1,5	2,0						
3,0		1,0								
3,5	0,5									

Angaben in Anteil Wasser pro Gewichtsteil Kleie

konnten diese beiden Versuche zusammen ausgewertet werden (Fig. 21). In weiteren Versuchen bei 25°C wurde der Einfluss der Schichthöhe bei verschiedenen Feuchtigkeitsgraden untersucht; es wurden in 2 Versuchen 3 g bzw. 20 g Kleie pro Kolben eingewogen. Die Untersuchung über den Einfluss des Wassergehaltes beschränkte sich in diesen Fällen auf die unterstrichenen Kombinationen im Versuchsschema. Der totale Anteil Wasser

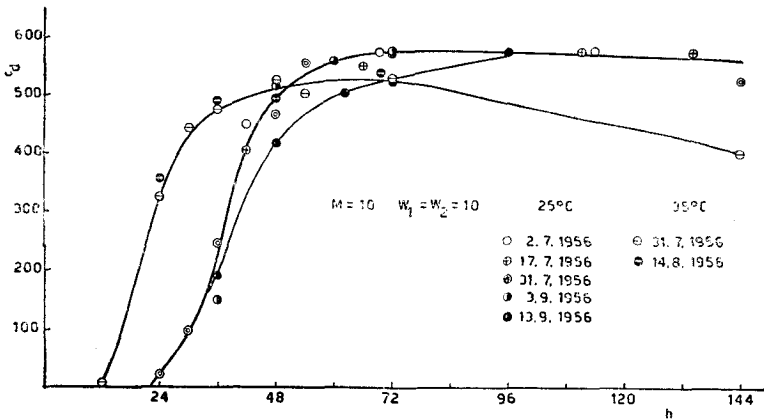


Fig. 21. Reproduzierbarkeit der Versuche mit 10 g Kleie pro Kolben bei den Temperaturen 25° und 35° C.

von 0,5, 1, 2 und 4 wurde somit eingestellt einerseits durch Zugabe von 0,5, 1, 2 und 4 Teilen Wasser nach der Sterilisation bzw. durch Zugabe von 0,5, 1,5 und 3,5 Teilen Wasser vor der Sterilisation und je 0,5 Teilen Wasser nach der Sterilisation (Tabelle 23 und 24).

Tabelle 22a

Einfluss des Wassergehaltes der Kleie auf die Bildung dextrinierender *Einzyme*

Temp. = 25°C

M = 10 g

Zeit h	$W_2 = 5$						$W_2 = 10$					
	$W_1 = 0^1$		$W_1 = 5$		$W_1 = 10$		$W_1 = 5$		$W_1 = 10$		$W_1 = 15$	
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
24 ²	6,15	44	6,12	44	—	—	—	—	—	—	—	—
42	6,07	333	6,15	345	6,23	400	6,21	276	6,24	408	6,28	400
66	6,18	512	6,30	587	6,25	548	6,02	481	6,31	523	6,28	548
110	6,91	535	7,25	572	7,33	633	—	547	7,40	560	7,33	572
134	7,25	523	7,69	617	7,55	572	7,22	587	7,80	572	7,82	572
180	—	—	7,92 ²	602 ²	7,92	602	—	—	8,02	587	8,03	617

Zeit h	$W_2 = 15$						$W_2 = 20$					
	$W_1 = 0$		$W_1 = 5$		$W_1 = 10$		$W_1 = 5$		$W_1 = 10$		$W_1 = 15$	
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
18	6,25	1	6,13	1	6,10	1	6,25	1	6,12	1	6,10	1
38 ^a	6,35	250	6,25	353	6,21	333	—	—	—	—	—	—
42	6,28	364	6,38	471	6,30	436	6,35	343	6,34	364	6,16	296
66	6,22	666	6,35	587	6,35	587	6,29	651	6,38	446	6,47	363
138	7,58	666	7,65	632	7,62	617	7,43	750	7,44	649	7,26	490
162 ²	7,95	666	7,96	632	7,84	572	7,98	707	7,71	548	7,45	560

Mittelwerte aus 2 Parallelen

¹ Diese Kombination wurde in einem späteren Versuch durchgeführt² Nur 1 Parallele

Tabelle 22b

Einfluss des Wassergehaltes der Kleie auf die Bildung dextransierender Enzyme (Ergänzung zu Tabelle 22a)

Temp. = 25° C

M = 10 g

Zeit h	$W_2 = 5$				$W_2 = 10$				$W_2 = 15$			
	$W_1 = 0$		$W_1 = 25$		$W_1 = 10$		$W_1 = 20$		$W_1 = 30$		$W_1 = 25$	
	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d
36	6,22	85	5,98	160	5,93	149	6,17	187	6,95	138	6,00	58
48	5,99	169	6,22	394	6,23	286	6,16	411	6,21	370	6,00	123
62	5,75	230	6,38	480	6,38	324	6,15	500	6,40	454	6,20	162
72	5,87	264	6,42	500	6,44	364	6,22	522	6,36	473	6,16	170
96	6,14	312	6,60	500	6,60	353	6,74	572	6,55	473	6,30	180
	$W_2 = 20$				$W_2 = 30$				$W_2 = 40$			
	$W_1 = 20$		$W_1 = 5$		$W_1 = 0$		$W_1 = 10$		$W_1 = 5$		$W_1 = 0$	
Zeit h	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d
36	5,99	42	5,91	98	6,25	84	5,92	53	6,00	60	6,23	17
48	6,00	74	6,21	265	6,31	260	6,11	120	6,02	174	6,25	96
62	6,10	112	6,29	338	6,40	422	6,14	175	6,20	190	6,34	153
72	6,13	102	6,34	371	6,45	481	6,25	225	6,19	190	6,32	170
96	6,20	149	6,43	382	6,58	512	6,19	123	6,26	317	6,29	233

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Tabelle 23

Einfluss des Wassergehaltes der Knete auf die Bildung dex-trinsierender Enzyme

Temp. = 25°C

M = 3 g

Zeit h	$W_2 = 1,5$			$W_2 = 3$			$W_2 = 6$			
	$W_1 = 0$	$W_1 = 1,5$	$W_1 = 4,5$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
36	6,12	130	6,18	185	6,16	198	5,93	124	6,20	129
48	5,70	270	5,95	375	5,96	445	6,00	293	5,97	348
60	5,57	376	5,86	473	6,20	522	6,33	430	6,35	420
72	5,65	406	5,95	535	6,14	511	6,39	338	5,98	455
94	5,99	415	6,12	482	7,02	535	6,66	353	6,78	473

Mittelwerte aus 2 Parallelföhen

Tabelle 24

Einfluss des Wassergehaltes der Knete auf die Bildung dex-trinsierender Enzyme

Temp. = 25°C

M = 20 g

Zeit h	$W_2 = 10$			$W_2 = 20$			$W_2 = 40$			
	$W_1 = 0$	$W_1 = 10$	$W_1 = 30$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
36	5,93	90	5,98	138	6,37	151	6,01	110	6,18	71
48	5,98	195	6,09	320	6,40	387	6,28	229	6,20	218
60	5,86	250	6,00	388	6,29	511	6,40	242	5,96	376
72	5,92	282	6,21	415	6,28	572	6,42	245	6,12	500
94	6,12	300	6,48	472	6,61	587	6,36	279	6,38	500

Mittelwerte aus 2 Parallelföhen

Tabelle 25

Einfluss des Wassergehaltes der Kleie auf die Bildung dextrinierender Enzyme

Temp. = 35°C

M = 10 g

Zeit h	$W_2 = 10$											
	$W_1 = 5$				$W_1 = 10$				$W_1 = 15$			
	$W_1 = 0$	$W_1 = 5$	$W_1 = 10$	$W_1 = 15$	$W_1 = 0$	$W_1 = 5$	$W_1 = 10$	$W_1 = 15$	$W_1 = 0$	$W_1 = 5$	$W_1 = 10$	$W_1 = 15$
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
24	6,35	148	6,48	267	6,46	282	6,25	277	6,51	250	6,40	353
36	6,19	276	6,33	415	6,41	465	6,48	472	6,32	445	6,55	490
48	6,46	329	6,62	455	6,65	524	6,49	535	6,56	523	6,48	490
70	6,70	343	7,33	465	7,39	500	7,39	547	7,42	500	7,58	536

Zeit h	$W_2 = 20$											
	$W_1 = 5$				$W_1 = 10$				$W_1 = 15$			
	$W_1 = 0$	$W_1 = 5$	$W_1 = 10$	$W_1 = 15$	$W_1 = 0$	$W_1 = 5$	$W_1 = 10$	$W_1 = 15$	$W_1 = 0$	$W_1 = 5$	$W_1 = 10$	$W_1 = 15$
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
24	6,38	274	6,44	354	6,30	308	6,20	256	6,46	286	6,22	249
36	6,28	500	6,41	480	6,56	455	6,60	415	6,41	480	6,64	415
48	6,39	535	6,46	445	6,50	462	6,67	397	6,53	500	6,64	400
60	7,01	535	6,95	523	6,70	546	6,84	477	6,93	512	6,85	445

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Tabelle 26

Einfluss des Wassergehaltes der Kleie auf die Bildung dex-trinsierender Enzyme

Temp. = 35°C

M = 5 g

Zeit h	W ₂ = 2,5				W ₂ = 5				W ₂ = 17,5									
	W ₁ = 0	W ₁ = 2,5	W ₁ = 5	W ₁ = 7,5	W ₁ = 0	W ₁ = 2,5	W ₁ = 5	W ₁ = 7,5	W ₁ = 0	W ₁ = 2,5	W ₁ = 5	W ₁ = 7,5	pH	c _d				
24	5,95	248	6,21	338	6,25	365	6,17	376	6,29	370	6,28	443	6,37	445	6,32	394	6,20	110
36	5,73	412	5,95	502	6,12	602	6,18	617	6,04	550	6,27	602	6,32	602	6,43	602	6,36	303
48	6,02	444	6,57	536	6,49	587	6,30	617	6,36	500	6,49	558	6,42	617	6,40	666	6,47	300
60	6,50	468	7,12	512	7,51	583	7,28	666	7,45	512	7,62	602	7,47	633	7,12	666	6,67	308

Zeit h	W ₂ = 7,5				W ₂ = 10				W ₂ = 20									
	W ₁ = 0	W ₁ = 2,5	W ₁ = 5	W ₁ = 7,5	W ₁ = 0	W ₁ = 2,5	W ₁ = 5	W ₁ = 7,5	W ₁ = 0	W ₁ = 2,5	W ₁ = 5	W ₁ = 7,5	pH	c _d				
24	6,44	343	6,48	417	6,47	381	6,18	286	6,37	282	6,20	312	6,18	304	6,04	172	6,20	55
36	6,43	535	6,11	572	6,13	572	6,22	523	6,21	512	6,14	572	6,24	535	6,29	409	6,25	175
48	6,68	535	6,63	546	6,49	620	6,47	587	6,59	535	6,57	587	6,59	587	6,63	476	6,39	228
60	7,29	572	7,15	572	7,06	638	6,77	602	7,02	572	6,83	666	6,80	635	6,75	490	6,52	226

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Tabelle 27
Einfluss des Wassergehaltes der Kleie auf die Bildung dextrinierender Enzyme
 Temp. = 35°C
 M = 3 g

Zeit h	$W_2 = 1,5$			$W_2 = 3$			$W_2 = 6$			$W_2 = 12$				
	$W_1 = 0$	$W_1 = 1,5$	$W_1 = 4,5$	$W_1 = 0$	$W_1 = 3$	$W_1 = 10,5$	$W_1 = 0$	$W_1 = 6$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
24	6,02	232	6,16	343	6,28	388	5,95	253	6,12	303	5,99	91	6,16	218
36	5,66	384	5,91	551	6,20	617	6,54	388	6,30	524	6,18	291	6,18	291
48	5,85	472	6,15	535	6,30	633	6,36	400	6,17	462	6,09	546	6,18	291
60	6,25	435	6,89	490	6,99	617	6,86	382	7,29	424	7,13	512	6,88	242
72	6,56	400	7,36	460	7,57	555	7,40	385	7,69	435	7,43	482	6,57	208

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Tabelle 28
Einfluss des Wassergehaltes der Kleie auf die Bildung dextrinierender Enzyme
 Temp. = 35°C
 M = 20 g

Zeit h	$W_2 = 10$			$W_2 = 20$			$W_2 = 40$			$W_2 = 80$		
	$W_1 = 0$	$W_1 = 10$	$W_1 = 30$	$W_1 = 0$	$W_1 = 20$	$W_1 = 70$	$W_1 = 0$	$W_1 = 40$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$	$W_1 = 0$
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
24	5,94	121	6,00	154	5,90	167	5,95	135	6,01	129	6,02	15
36	6,09	245	6,23	290	6,24	300	6,04	197	6,15	240	5,93	25
48	6,08	290	6,05	370	6,24	338	6,22	320	6,24	293	6,07	40
60	6,32	308	6,45	415	6,46	364	6,34	201	6,35	445	6,00	—
72	6,62	320	6,62	444	6,26	455	6,28	187	6,40	348	5,94	50

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Der Einfluss des Wassergehaltes in seinen Einzelheiten wurde auch noch bei 35°C und Kleiemengen von 5 und 10 g pro Kolben untersucht, entsprechend dem viereckig eingerahmten Teil des Schemas 1 (Tabelle 25 und 26). Für 3 und 20 g Kleie wurden bei 35°C wieder die unterstrichenen Kombinationen gewählt (Tabelle 27 und 28).

413. Besprechung der Ergebnisse

a) Reproduzierbarkeit der Versuche

Aus den mitgeführten Kontrollen, deren Ergebnisse in Figur 21 und 22 graphisch dargestellt sind, ist ersichtlich, dass die Streuung in den Messungen tragbar ist. Es ist somit gestattet, alle durchgeführten Versuche miteinander zu vergleichen.

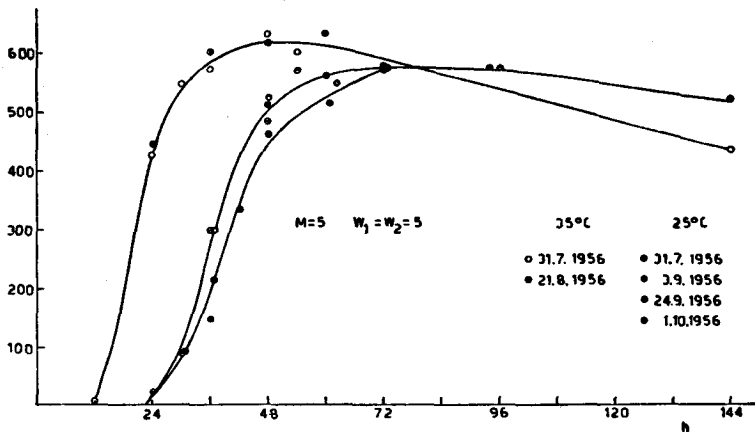


Fig. 22. Reproduzierbarkeit der Versuche mit 5 g Kleie pro Kolben bei den Temperaturen 25° und 35°C.

b) Zeitlicher Verlauf der Enzymbildung

Die Ergebnisse der bei 25°C durchgeführten Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen: nach einer Bebrütungszeit von etwa 60 Stunden ist in fast allen Fällen das Maximum der dextrinogenen Aktivität entweder schon erreicht, oder es finden nur noch kleine Zunahmen statt. Eine Ausnahme bilden hier die Kombinationen mit extrem hohem und tiefem Wassergehalt, indem hier die relative Zunahme der Aktivität nach 60 Stunden noch bemerkenswert ist.

Bei 35°C ist das Maximum der Diastase-Bildung in der Regel nach 36 bis 48 Stunden erreicht. Ausnahme bilden wieder die Kombinationen mit extremem Wassergehalt, wo eine Kulturzeit von 60 Stunden oder mehr notwendig ist.

c) Maximale Ausbeute an dextrinogener Amylase

Aus den Tabellen 22 bis 28 ist ersichtlich, dass die maximale Ausbeute in empfindlicher Weise von Temperatur sowie Wassergehalt und Schichthöhe der Kleie beeinflusst wird. Die maximalen Ausbeuten in den durchgeführten Versuchen sind in den Figuren 23 bis 27 dargestellt.

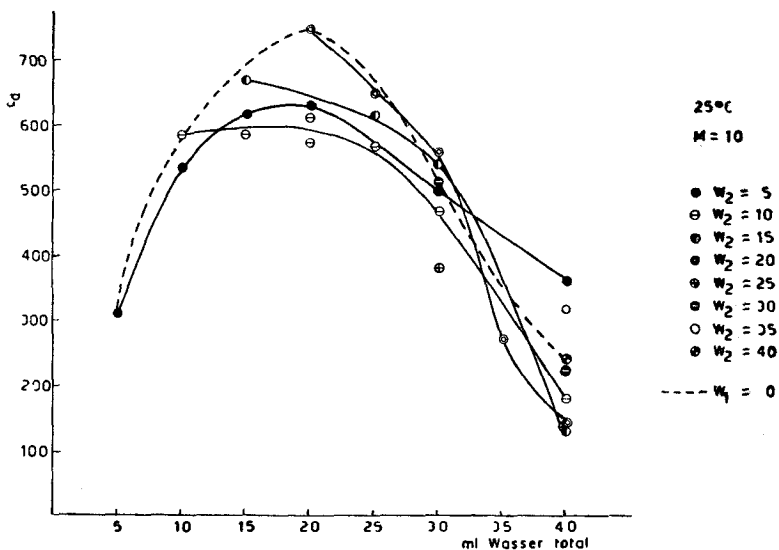


Fig. 23. Die maximalen Ausbeuten an dextrinogener Amylase bei 25°C und 10 g Kleie pro Kolben. Durchschnitt aller durchgeführten Zeitversuche (Tabellen 22a und 22b).

Fig. 23, welche die maximale Ausbeute von Tabelle 22a und 22b, sowie Fig. 24 und 25, welche die maximalen Werte von Tabelle 25 und 26 wiedergeben, lassen erkennen, dass, abgesehen von den Fällen, wo keine Wasserzugabe vor der Sterilisation erfolgte, es zur Hauptsache auf den totalen Wassergehalt der Kleie ankommt. Nur bei dem 4fachen Anteil sind die Streuungen um den Mittelwert grösser. In den andern Fällen ist es von untergeordneter Bedeutung, wieviel Wasser vor und wieviel nach der Sterilisation zugegeben wird. Aus diesem Grunde wurden für diese Versuche Mittelwerte berechnet, mit Ausnahme der Fälle, wo kein Wasser vor der Sterilisation zugegeben wurde. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigen Fig. 26 und 27, wo auch die Ergebnisse der Versuche mit höheren Schichten dargestellt sind. Sie lassen die sehr komplexe Wechselwirkung von Temperatur, Feuchtigkeitsgehalt und Schichthöhe erkennen; jeder einzelne Faktor wirkt sich etwas anders aus, je nach den Werten der beiden andern Faktoren.

Um die Gesetzmässigkeiten zu erkennen, werden anschliessend die einzelnen Versuche bei den verschiedenen Schichthöhen und Temperaturen unter jeweiliger Betrachtung des Wassergehaltes als Variable besprochen

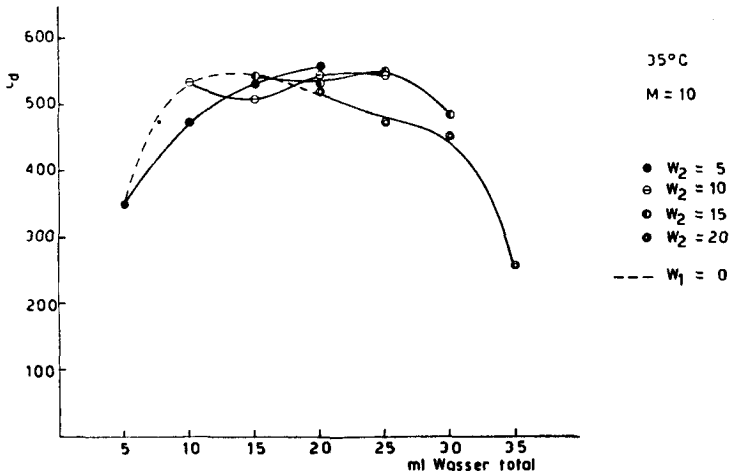


Fig. 24. Die maximalen Ausbeuten an dextrinogener Amylase bei 35°C und 10 g Kleie pro Kolben. Durchschnitt aller durchgeführten Zeitversuche (Tabelle 25).

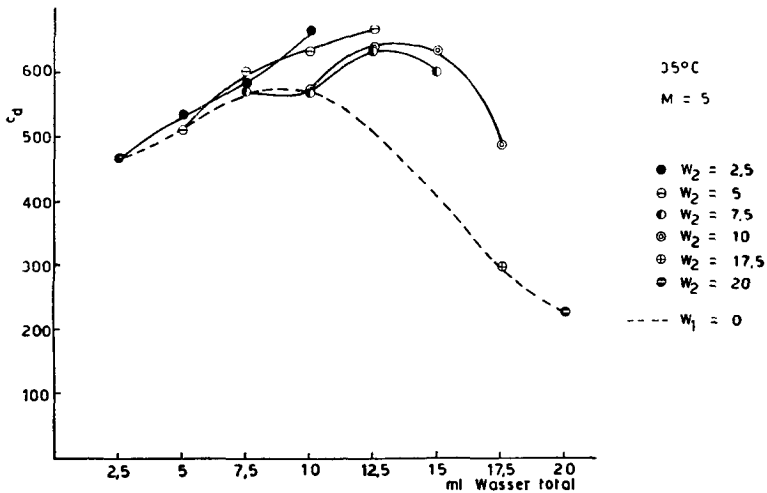


Fig. 25. Die maximalen Ausbeuten an dextrinogener Amylase bei 35°C und 5 g Kleie pro Kolben. Durchschnitt aller durchgeführten Zeitversuche (Tabelle 26).

(Schichthöhe und Temperatur sind Parameter, Wassergehalt ist die unabhängige und Aktivität ist die abhängige Variable). Der Einfachheit halber werden Schichthöhe (Kleiemenge), Temperatur und Wassergehalt mit ihren Symbolen M , T und W bezeichnet; \neq bedeutet „verschieden“ oder „ungleich“.

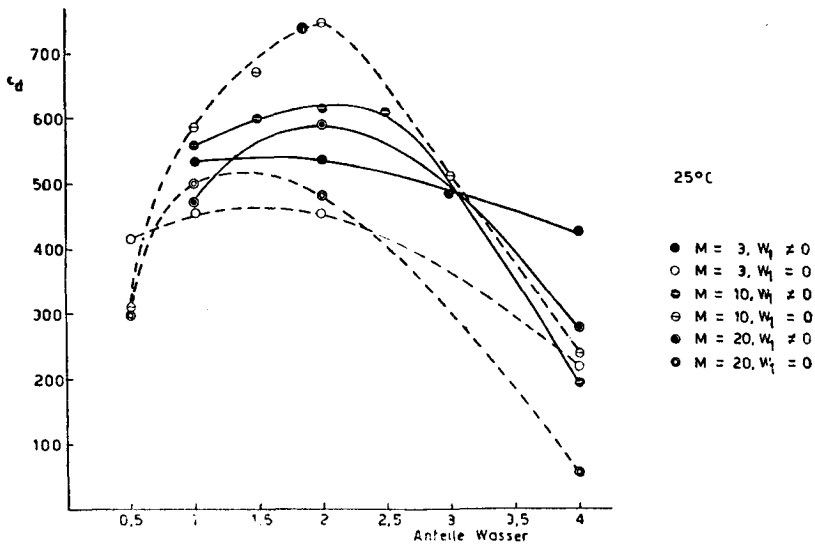


Fig. 26. Einfluss des Wassergehaltes der Kleie auf die maximale Ausbeute an dextrinogener Amylase bei drei verschiedenen Schichthöhen der Kleie und einer Temperatur von 25°C.

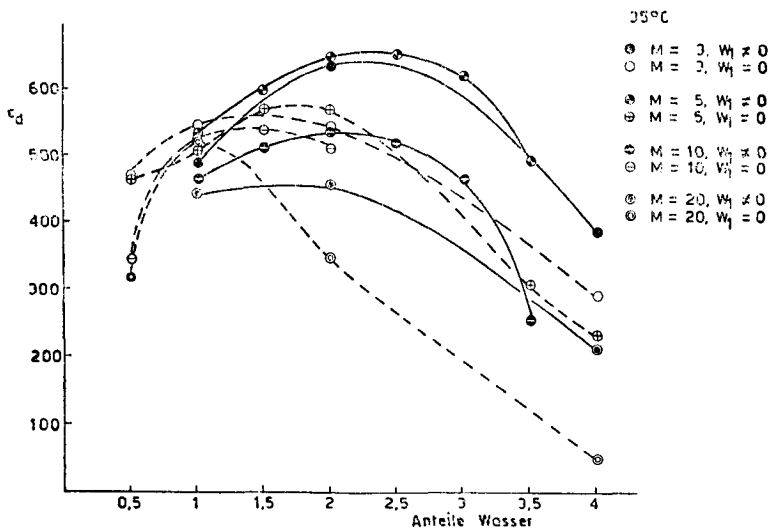


Fig. 27. Einfluss des Wassergehaltes der Kleie auf die maximale Ausbeute an dextrinogener Amylase bei vier verschiedenen Schichthöhen der Kleie und einer Temperatur von 35°C.

1a) $M = 3, T = 25, W_1 \neq 0$. Hier ist der Einfluss des Wassers verglichen mit dem Effekt bei andern Schichthöhen bei derselben Temperatur offensichtlich am geringsten. Wenn auch der 4fache Wasseranteil nicht stark schadet, so scheint es, dass der optimale Feuchtigkeitsgrad durch den 1- bis 2fachen Wasseranteil eingestellt wird. Im allgemeinen sind die Ausbeuten bei dieser Schichthöhe und Temperatur nicht sehr gut.

1b) $M = 3, T = 25, W_1 = 0$. In diesem Fall sind die Ausbeuten über den ganzen Bereich der untersuchten Feuchtigkeitsstufen allerdings noch schlechter als im vorhergehenden Versuch. Extrem hohe Wassergehalte wirken sich schlechter aus als bei $W_1 \neq 0$. Die beste Aktivität wird auch hier bei dem 1- bis 2fachen Wasseranteil festgestellt.

2a) $M = 3, T = 35, W_1 \neq 0$. Deutlich verschieden wirkt sich die kleinste Schichthöhe bei 35°C aus. Es ist klar ersichtlich, dass im optimalen Bereich des Wassergehaltes, welcher hier übrigens zwischen dem 2- bis 2,5-, eventuell bis 3fachen Anteil zu liegen scheint, die Ausbeute an dextrinogener Amylase mit 650 Einheiten um rund 100 Einheiten grösser ist als im analogen Fall bei 25°C (im optimalen Bereich bei dem 1- bis 2fachen Anteil Wasser). Es sei aber bemerkt, dass bei 35°C und $W_1 \neq 0$ nicht so viele Untersuchungen vorliegen; in allen Punkten stimmen aber die Ergebnisse mit dem analogen Versuch $M = 5$ überein, und man wird wohl annehmen dürfen, dass im Bereich des 2- bis 3fachen Wasseranteils keine grossen Abweichungen zu erwarten sind. Extrem hohe und tiefe Wassergehalte haben grösseren Effekt als bei 25°C.

2b) $M = 3, T = 35, W_1 = 0$. Es ist charakteristisch, dass die maximalen Ausbeuten mit etwa 550 Einheiten wieder um rund 100 Einheiten kleiner sind als im vorhergehenden Fall. Zudem liegt der optimale Feuchtigkeitsbereich zwischen dem 1- bis 2fachen Anteil Wasser. Bei 25°C im analogen Versuch wurde eine ähnliche Kurve erhalten, die Ausbeuten sind bei 35°C aber um durchschnittlich 75 Einheiten grösser.

3) $M = 5, T = 35$. Hier wirkt sich der Wassergehalt in allen Fällen, mit kleinen Abweichungen, sowohl bei $W_1 = 0$, als auch bei $W_1 \neq 0$ entsprechend gleich aus wie bei 35°C und $M = 3$.

4a) $M = 10, T = 25, W_1 \neq 0$. Die grössere Schichthöhe wirkt sich im optimalen Bereich des Wassergehaltes von 1,5 bis 2,5 Anteilen mit einer kleinen Erhöhung der enzymatischen Aktivität aus (rund 80 Einheiten), verglichen mit dem analogen Fall bei $M = 3$. Der 4fache Wasseranteil gibt aber bedeutend kleinere Aktivitäten als im Falle von $M = 3$.

4b) $M = 10, T = 25, W_1 = 0$. Es werden unter diesen Bedingungen im optimalen Feuchtigkeitsbereich noch bessere Ausbeuten erzielt als bei $W_1 \neq 0$. Beim 2fachen Wasseranteil wird die grösste Aktivität (750 Einheiten) aller Versuchskombinationen festgestellt. Der Einfluss des Feuchtig-

keitsgrades ist sehr stark ausgeprägt. Der optimale Bereich liegt sehr eng beim doppelten Anteil Wasser. Unter- und oberhalb dieses Punktes erfolgt steile Abnahme der Aktivität.

5a) $M = 10, T = 35, W_1 \neq 0$. Entgegengesetzt den Resultaten bei 25°C werden hier kleinere Ausbeuten erzielt als in den analogen Fällen bei kleinen Schichthöhen. Im optimalen Feuchtigkeitsbereich bleiben die Aktivitäten hinter denjenigen bei 25°C zurück.

5b) $M = 10, T = 35, W_1 = 0$. Bei etwa gleich grossen maximalen Ausbeuten wie im vorhergehenden Versuch ist unter diesen Bedingungen der optimale Feuchtigkeitsbereich nach dem 1- bis 2fachen Wasseranteil hin verschoben. Da die Resultate bei den grösseren Wassergehalten fehlen, kann hier keine Aussage über die Ausbeute gemacht werden. Entsprechend dem Kurvenverlauf analoger Versuche bei 35°C und $W_1 = 0$ scheinen die Werte zwischen denen von $M = 5$ und $M = 20$ zu liegen.

6a) $M = 20, T = 25, W_1 \neq 0$. Es werden auch bei dieser grossen Schichthöhe noch recht gute Ausbeuten im optimalen Bereich des Wassergehaltes, welcher beim doppelten Anteil liegt, erzielt. Die hier gemessene Aktivität ist höher als diejenige bei $M = 3, T = 25$ und kommt nahe an den bei $M = 10$ gemessenen Wert heran. Die Ausbeute wird aber empfindlich beeinflusst durch höhere oder tiefere Feuchtigkeitsgrade.

6b) $M = 20, T = 25, W_1 = 0$. Der optimale Wassergehalt liegt zwischen dem 1- bis 2fachen Anteil. Es werden kleinere Ausbeuten erzielt als im Falle wo $W_1 \neq 0$. Die höchste Feuchtigkeitsstufe ergibt bei dieser grossen Schichthöhe die kleinste Aktivität aller Versuche bei 25°C .

7a) $M = 20, T = 35, W_1 \neq 0$. Bei 35°C stehen die Verhältnisse für grosse Schichthöhen nicht derart günstig wie bei 25°C . So werden beim optimalen Wassergehalt mit 450 Einheiten etwa 130 Einheiten weniger an dextrinisierenden Enzymen gebildet als im analogen Fall bei 25°C . Während bei 25°C die hohe Schicht im optimalen Feuchtigkeitsbereich eine Ausbeute ergibt, welche zwischen derjenigen von $M = 3$ und $M = 10$ liegt, werden bei 35°C in allen Versuchen die geringsten Aktivitäten gebildet (immer bei $W_1 \neq 0$). Aber es werden doch immerhin noch etwa gleich grosse Ausbeuten erreicht wie bei 25°C und $M = 3$ bzw. $W_1 = 0$. Der optimale Wassergehalt liegt zwischen dem 1- und 2fachen Anteil.

7b) $M = 20, T = 35, W_1 = 0$. Noch krasser als im vorhergehenden Fall wirkt sich die grosse Schichthöhe aus, wenn $W_1 = 0$. Ein sehr enger optimaler Feuchtigkeitsbereich liegt beim gleichen Anteil Wasser wie Kleie, sogar mit einer besseren Ausbeute als im besten Fall bei $W_1 \neq 0$ und einer praktisch gleich grossen Ausbeute wie in den analogen Fällen mit kleinerer Schichthöhe. Unter- und oberhalb dieses Punktes erfolgt rasche Abnahme der Aktivität. Der 4fache Wasseranteil lässt, wie im analogen Fall bei 25°C , mit 50 Einheiten die kleinste Ausbeute aller Versuche erscheinen.

Allgemeine Schlüsse

a) Schlechteste Ausbeuten ergeben höchste und tiefste Wassergehalte unter allen Bedingungen.

b) Bei grosser Schichthöhe wirkt sich ein sehr hoher Wassergehalt sehr schlecht aus, insbesondere, wenn sämtliches Wasser nach der Sterilisation zugegeben wird, während bei kleinen Schichthöhen die Ausbeuten unter Umständen doch noch grösser sein können als in andern Fällen kleineren Feuchtigkeitsgrades.

c) Bei 35°C liegt das Optimum des Wassergehaltes für die Fälle, wo $W_1 \neq 0$ mehr bei den mittleren bis hohen Werten des Wassergehaltes, während es für $W_1 = 0$ deutlich mehr bei kleinerem Gehalt liegt. Bei 25°C kann eine derartige Gruppierung nicht vorgenommen werden; nur bei der extrem grossen Schichthöhe und $W_1 = 0$ sowie bei der extrem kleinen Schichthöhe mit sowohl $W_1 = 0$ als auch $W_1 \neq 0$ ist der optimale Bereich des Wassergehaltes nach dem 1- bis 2fachen Wasseranteil hin verschoben.

d) Während bei 35°C die kleinen Schichthöhen die besseren Ausbeuten ergeben, und diese mit zunehmender Schichthöhe ständig sinken (wenigstens dort, wo $W_1 \neq 0$), können fast gegenteilige Beobachtungen bei 25°C gemacht werden. Die besten enzymatischen Aktivitäten können bei mittlerer Schichthöhe erreicht werden, und bei der grössten Schichthöhe werden im optimalen Feuchtigkeitsbereich Aktivitäten erzielt, welche den besten bei 35°C erhaltenen Ausbeuten nicht weit nachstehen. Die kleinen Schichthöhen wirken sich bei 25°C durchschnittlich am schlechtesten aus.

414. *Diskussion über die Wechselwirkung von Temperatur, Wassergehalt und Schichthöhe der Kleie*

Nachfolgend wird versucht, eine Erklärung für einige hervorstechende Charakteristika dieser komplexen Wechselwirkung der untersuchten drei Faktoren, Wassergehalt, Schichthöhe und Temperatur, zu geben. Wie bei allen Erklärungsversuchen wird dabei versucht, die Auswirkung dieser Faktoren (hier als „primäre Faktoren“ bezeichnet) auf die Wirkung anderer Faktoren (sekundäre Faktoren), welche von den primären Faktoren beeinflusst werden, zurückzuführen.

a) *Die Natur der sekundären Faktoren*

Der Wassergehalt der Kleie wirkt sich aus, indem er die Konzentration der Nährstoffe und deren Zugänglichkeit (z.B. die Quellung der Stärke) sowie den osmotischen Druck beeinflusst. Auch die Zufuhr von Sauerstoff zu den inneren Schichten der Kleie ist vom Wassergehalt abhängig, indem die Lockerstruktur des Nährbodens verändert wird. Die Zugabe von Wasser vor und nach der Sterilisation wirkt sich auf die Quellung der Stärke aus: Wasserzugabe vor der Sterilisation ermöglicht die Quellung und lässt die Kleie etwas lockerer werden, so dass Sauerstoff trotz hohen Wassergehaltes wieder ins Innere diffundieren kann.

Die Schichthöhe scheint vor allem die Zufuhr von Sauerstoff (natürlich auch die Abfuhr von Kohlensäure) zu beeinflussen. Sie vermag aber auch die Temperatur im Innern des Kleiekuchens zum Steigen zu veranlassen, indem die durch den Pilz erzeugte Wärme bei hoher Schicht weniger gut abgeleitet wird (Temperatur ist dann ein sekundärer Faktor). In der Tat wurden wiederholt folgende maximale Temperaturen (T_1) im Innern des Kleiekuchens gemessen:

bei Bebrütungstemperatur von

25°C, $M = 10$	$T_1 = 27,5^\circ\text{C}$
25°C, $M = 20$ ($W_1 \neq 0$)	$T_1 = 30^\circ\text{C}$
35°C, $M = 20$ ($W_1 \neq 0$)	$T_1 = 40^\circ\text{C}$

Die Schichthöhe beeinflusst auch den Wassergehalt, indem die Verdunstung bei kleinen Schichten stärker ins Gewicht fällt.

Die Temperatur (Bebrütungstemperatur oder Temperatur im Innern des Nährbodens) beeinflusst das Wachstum des Pilzes und die Stabilität der Enzyme. Inwiefern Enzyymbildung und Wachstum zusammenhängen und welches der Einfluss der Temperatur auf die eigentliche Enzyymbildung (bei Ausschaltung der Enzyminaktivierung) ist, kann nicht an Hand unserer Experimente abgeklärt werden. Die Temperatur vermag auch den Wassergehalt der Kleie zu verändern, indem bei hoher Bebrütungstemperatur (welche bei diesen Untersuchungen auch noch mit einer niedrigeren relativen Luftfeuchtigkeit gekoppelt war) die Verdunstung intensiviert wird.

b) *Die Auswirkung der sekundären Faktoren im Zusammenhang mit den ausgeführten Messungen*

Es ist verständlich, dass bei den extrem grossen und tiefen Feuchtigkeitsgraden geringes Wachstum eintritt. So beträgt bei dem tiefsten untersuchten Wassergehalt ($\frac{1}{2}$ Teil Wasser pro 1 Teil Kleie) der Anteil der Trockensubstanz etwa 60% (bei Annahme von 10% Wasser in der lufttrockenen Kleie), was natürlich ausserordentlich hoch ist, verglichen mit den üblichen Nährböden. Der 4fache Wasseranteil vermag die Lockerstruktur der Kleie zu zerstören, insbesondere wenn sämtliches Wasser nach der Sterilisation zugegeben wird. In der Tat wurde beobachtet, dass der Pilz unter diesen Bedingungen sich nur an der Oberfläche in Form einer kompakten Haut entwickelt, während bei kleineren Wassergehalten der Kleiekuchen auch im Innern durchwachsen wird. Es erscheint somit verständlich, warum bei den tiefsten Wassergehalten die kleinsten Schichthöhen bessere Ausbeuten ergeben als die hohen Schichten. Bei den kleinsten Schichten wird der Gasaustausch nicht beeinträchtigt. Bei 3 g Kleie pro Kolben wird eine so kleine Schichthöhe erzielt, dass der Nährboden, obwohl mit Wasser gesättigt, praktisch vollständig mit Mycel durchzogen wird. Bei 25°C und einer Kleiemenge von 10 g pro Kolben werden bessere Ausbeuten erzielt (über den ganzen untersuchten Feuchtigkeitsbereich), wenn kein Wasser

vor der Sterilisation zugegeben wird. Bei kleinerer und höherer Schicht werden unter analogen Bedingungen die Ausbeuten (insbesondere im optimalen Bereich des Wassergehaltes) stark gesenkt. Dieser eigenartige Effekt ist schwer zu erklären. Es findet wohl Überlagerung vieler Faktoren statt.

Da die Struktur des Kleienährbodens durch Wasserzugabe vor der Sterilisation etwas lockerer wird, ist es verständlich, dass bei den hohen Schichten die Zugabe sämtlichen Wassers nach der Sterilisation, infolge Verhinderung des Gasaustausches, kleinere Aktivitäten im Substrat erscheinen lässt, als wenn auch ein Teil Wasser vor der Sterilisation zugegeben wird. Dies gilt insbesondere für hohe Wassergehalte.

Die Feststellung, dass die grössten Schichthöhen bei hoher Temperatur sich am ungünstigsten auswirken, findet wohl ihre Erklärung darin, dass der Gasaustausch (insbesondere bei $W_1 = 0$) behindert wird und die Temperatur im Innern des Nährbodens (bei $W_1 \neq 0$) zu stark steigt und somit eventuell Wachstumshinderung oder Verminderung der Enzyymbildung, sicher aber wesentliche Enzyminaktivierung bewirkt.

Sowohl die verminderte Verdunstung bei hoher Schicht, als auch die Behinderung des Gasaustausches bei hohen Feuchtigkeitsgraden, und zwar insbesondere bei hoher Schicht, erklären wohl, warum das Optimum des Wassergehaltes bei hohen Schichten eher bei den tieferen Werten liegt.

Wie gross der Einfluss der Bebrütungstemperatur ist, lässt sich wohl am besten ermessem, wenn man die höchsten Ausbeuten untereinander vergleicht, welche bei den grössten und kleinsten Schichthöhen bei 25°C bzw. bei 35°C erreicht werden. Es ist verständlich, dass bei einer Bebrütungstemperatur von 35°C die kleinsten Schichthöhen die besseren Ausbeuten ergeben, weil dann noch keine bedeutende Erwärmung des Kleieninnern erfolgt, während bei hohen Schichten die erreichten Temperaturen von etwa 40°C eine stärkere Inaktivierung bewirken (siehe z.B. die Geschwindigkeit der Aktivitätsabnahme nach Erreichung der maximalen Ausbeute bei hoher und tiefer Bebrütungstemperatur, Fig. 21 und 22). Bei 25°C hingegen sind im optimalen Feuchtigkeitsbereich die Ausbeuten bei kleineren Schichten geringer als bei mittleren und hohen Schichten. Es scheint, dass der Gasaustausch bei grossen Schichthöhen unter den betreffenden Bedingungen (z.B. bei $M = 20$ und $W_1 \neq 0$) noch genügend gut ist, um Wachstum zu ermöglichen; durch die Temperaturerhöhung im Innern des Nährbodens (27,5° bis 30°C) wird Wachstum und Enzyymbildung gefördert (die Inaktivierung der Amylasen bei diesen Temperaturen ist noch nicht so bedeutend, vgl. Fig. 21 und 22).

Um diese komplexe Wechselwirkung erschöpfender diskutieren zu können, d. h. um sie besser auf Grund der Auswirkung sekundärer Faktoren zu erklären, müssten genaue Messungen über das Gewicht der erwähnten sekundären Faktoren vorliegen (z. B. direkte Bestimmung der Abhängigkeit der Enzyymbildung von O_2 -Partialdruck, von Temperatur usw.), da die Wirkungen der einzelnen Faktoren je nach Bedingungen sich kompen-

sieren oder addieren. Ohne die genaue Kenntnis der Zahl und des Gewichts dieser Faktoren können nur die betrachteten Extremfälle einigermaßen zuverlässig erklärt werden.

42. EINFLUSS DES ALTERS DER IMPFKULTUR

In den vorher beschriebenen Versuchen wurde das Alter der Impfkultur immer konstant gehalten. Es ist aber von Interesse zu wissen, ob eine grosse Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch das Alter hervorgerufen werden kann. Aus den in Fig. 21 und 22 dargestellten Versuchen ist zudem ersichtlich, dass die spät ausgeführten Versuche (13.9.1956, $M = 10$, 25°C sowie 1.10.1956, $M = 5$, 25°C) eine etwas verlängerte Kulturzeit benötigen, um die Höchstausbeute an Amylasen zu erreichen. Ob diese schwache Differenz tatsächlich signifikant ist, ob es sich um einen Beginn der Degenerationserscheinungen als Folge zahlreicher Überimpfungen handelt, sollte aus einem Versuch hervorgehen, wo verschieden alte Impfkulturen, welche sich auch durch die Zahl der jeweils vorangegangenen Überimpfungen unterscheiden, miteinander verglichen werden. Es stand noch Impfmaterial zur Verfügung, von dem die parallel angesetzten Kulturen in früheren Versuchen zur Impfung dienten. Die bei Zimmertemperatur aufbewahrten Schrägagar-Kulturen unterschieden sich somit voneinander sowohl durch das Alter als auch durch die Zahl der Überimpfungen, welche den einzelnen Kulturen vorausgingen: je älter die Impfkultur, um so zahlreicher die vorangegangenen Überimpfungen.

Die Prüfung der enzymatischen Aktivität wurde wie bisher auf Kleie untersucht. Tabelle 29 und Fig. 28 geben die Resultate wieder. Es ist ersichtlich, dass bei den beiden ältesten Kulturen eine zeitliche Verzögerung in

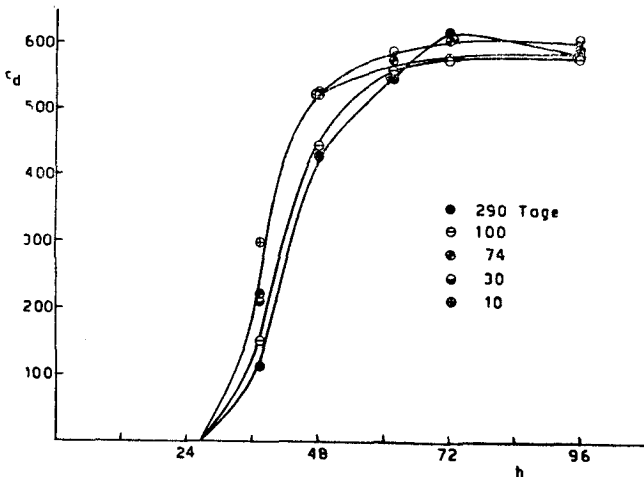


Fig. 28. Einfluss des Alters der Impfkultur auf die Bildung dextrinogener Amylasen.

der Bildung von Amylasen eintritt. Die maximalen Ausbeuten sind aber nach 70 Stunden ungefähr die gleichen in allen Kulturen. Es wurde streng darauf geachtet, dass der Nährboden in allen Fällen mit der gleichen Zahl Konidien beimpft wurde (10^6 Konidien pro g Kleie). Es ist somit der gegenteilige Effekt eingetreten, wie zu erwarten wäre, wenn eine Degeneration des Impfmateri als, hervorgerufen durch die wiederholten Überimpfungen, eingetreten wäre. Die zeitlich verzögerte Bildung amylolytischer Enzyme bei alten Kulturen ist sicher zum Teil auf verminderte Keimfähigkeit der Konidien zurückzuführen. Die Impfsuspensionen wurden auf Keimfähigkeit untersucht. Dabei zeigte sich, wie aus Tabelle 30 hervorgeht, dass eine deutliche Abnahme der Keimfähigkeit (nach 48 Stunden Bebrütung bei 25°C) mit dem Alter einhergeht.

Der Einfluss der Zahl der keimfähigen Konidien auf die Enzyymbildung wurde noch nicht in ausgedehnten Versuchen geprüft. Der in Tabelle 31 und Fig. 29 dargestellte Versuch, wo von einer Konidiensuspension 10^6 bzw. $18 \cdot 10^6$ Konidien pro g Kleie geimpft wurden, lässt aber schon einen Einfluss erkennen. Die erhöhte Keimzahl rief ein deutlich schnelleres Ansteigen der enzymatischen Aktivität hervor.

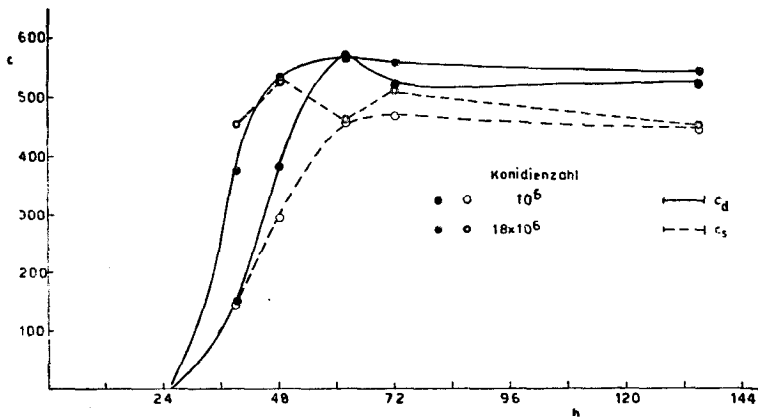


Fig. 29. Einfluss der Zahl der Impfkönidien auf die dextrinogene und saccharogene Aktivität.

Das Nichtzutreffen von Degenerationserscheinungen (in bezug auf die enzymatische Aktivität) wurde durch einen Versuch bestätigt, wo verschiedene Impfkulturen verwendet wurden, die gleiches Alter (bezogen auf die letzte Impfung) aufwiesen, welche aber aus Kulturen verschiedenen Alters (somit verschiedener Zahl an vorangegangenen Überimpfungen) angesetzt wurden. Die in den vorhergehenden Versuchen angewandten Kulturen wurden wieder auf Bierwürze-Agar ausgestrichen und nach 10 Tagen Bebrütungszeit auf enzymatische Aktivität geprüft. Wie aus Tabelle 32 hervorgeht, reagierten alle Impfkulturen gleichartig.

Tabelle 29

Einfluss des Alters der Impfkultur auf die Bildung dextrinisierender Enzyme

Temp. = 25°C

$W_1 = W_2 = 5$ ml

$M = 5$ g

Zeit h	Alter der Impfkultur, Tage									
	290		100		74		30		10	
	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d	pH	ϵ_d
37	6,25	115	6,22	154	6,26	222	6,20	213	6,22	300
48	6,20	430	6,21	445	6,18	522	6,04	522	6,13	522
62	6,23	559	6,28	559	6,27	572	6,14	587	6,13	546
72	6,32	617	6,32	572	6,42	602	6,25	602	6,24	572
96	7,27	587	7,24	572	7,42	572	7,23	602	7,25	572

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Tabelle 30

Einfluss des Alters der Kulturen auf die Keimfähigkeit der Konidien

Temp. = 25°C

Zeit = 48 Stunden

Zahl der Konidien in jeder Suspension (Zählkammer) 10^6

a: Keimzahl auf Bierwürze-Agar, 2 Parallelen } bestimmt bei

b: Keimzahl auf Stärke-Agar, 5 Parallelen } 10^5 facher Verdünnung

Alter Tage		290	100	74	30	10
Keimzahl in 10^6 /ml	a	0,65	1,65	3,4	4,0	6,1
	b	0,60	1,48	2,18	4,5	6,5

Tabelle 31

Einfluss der Impfdichte auf die Bildung dextrinisierender und verzuckernder Enzyme

Temp. = 25°C

$W_1 = W_2 = 5$ ml

$M = 5$ g

Zeit h	10 ⁶ Konidien/ml				18 × 10 ⁶ Konidien/ml			
	pH	c_d	c_s	$\frac{c_d}{c_s}$	pH	c_d	c_s	$\frac{c_d}{c_s}$
39	6,00	149	142	1,05	6,10	375	453	0,825
48	6,12	382	284	1,34	6,04	533	535	1,00
62	6,11	570	457	1,25	6,10	572	454	1,26
72	6,04	522	467	1,11	6,21	558	510	1,10
135	7,55	522	446	1,17	7,61	545	447	1,22

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Tabelle 32

Einfluss der Impfkultur, angesetzt aus Vorkulturen verschiedenen Alters

Temp. = 25°C

$W_1 = W_2 = 5$ ml

Alter der Impfkultur = 10 Tage

$M = 5$ g

Zeit h	Alter der Vorkultur, Tage									
	290		100		74		30		10	
	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d	pH	c_d
37	6,14	238	6,20	270	6,12	209	6,18	258	6,00	214
42	6,12	354	6,13	376	6,08	358	6,12	408	6,05	329
48	6,13	481	6,05	500	6,13	454	6,05	481	6,09	462
61	6,25	522	6,20	545	6,26	500	6,22	534	6,17	511
72	6,28	545	6,27	522	6,20	522	6,23	534	6,15	522

Mittelwerte aus 2 Parallelen

43. EINFLUSS DES pH IM KLEIESUBSTRAT AUF DIE BILDUNG DIASTATISCHER ENZYME

Das pH des Kleiesubstrats verändert sich beim Wachstum des Pilzes im allgemeinen nur sehr wenig. Die Pufferung dieses Nährbodens ist wesentlich grösser als diejenige zahlreicher synthetischer Substrate. Aus einigen Orientierungsversuchen mit synthetischen Nährlösungen wurde festgestellt, dass das pH meistens sehr schnell bis unter 4 sinkt. Die Ausbeute an Amylasen war sehr gering. Durch erhöhte Pufferung konnte höhere diastatische Aktivität festgestellt werden. Es war von Interesse zu wissen, wie stark die enzymatische Aktivität des Pilzes auf Kleie durch das pH beeinflusst werden kann. In den betreffenden Versuchen wurde das Substrat auch auf saccharogene Aktivität geprüft. An Hand des Verhältnisses der dextrinogenen zur saccharogenen Aktivität versuchten wir festzustellen, ob eine Veränderung in der Zusammensetzung der Enzyme im Verlauf der Kulturzeit und durch die Einwirkung des pH eintritt.

Das pH der Kleie wurde durch Säure- bzw. Laugezusatz (Mengen aus Vorversuchen ermittelt) auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Zusätze erfolgten vor der Sterilisation, das pH wurde aber erst nach der Sterilisation gemessen. Es ist aber zu beachten, dass durch die Zufuhr von Säure oder Lauge nicht nur Wasserstoff- oder Hydroxylionen, sondern zu gleicher Zeit auch die in der Säure enthaltenen Anionen und die in der Lauge enthaltenen Kationen zugegeben werden. Um einen exakten Vergleich zu haben, muss demnach auch jener Einfluss ausgeschaltet werden. Man kann bei gleichem pH den Einfluss der gleichzeitig zugegebenen Anionen oder Kationen prüfen, indem das gewünschte pH durch mehrere Säuren und Laugen eingestellt wird. In unserem Versuch wurde vorläufig nur der

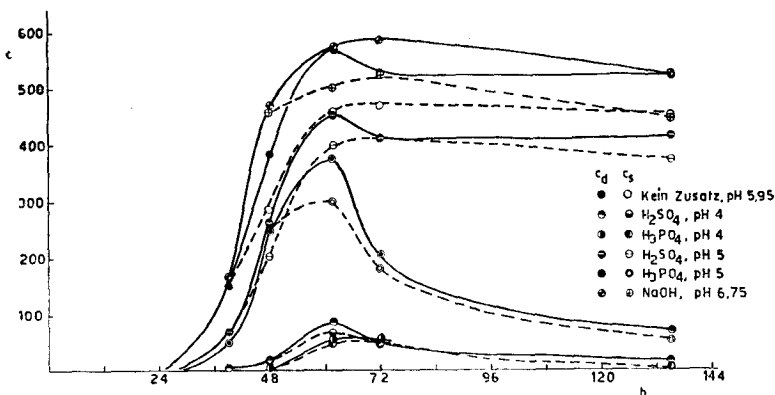


Fig. 30. Einfluss der Zusätze von Säure und Lauge zur Kleie auf die dextrinogene und saccharogene Aktivität.

Tabelle 33

*Einfluss des pH auf die Bildung dextrinisierender und verzuckernder Enzyme*Temp. = 25°C $W_1 = W_2 = 5$ ml $M = 5$ g

Zeit h	Ausgangs-pH = 5,95 (kein Zusatz)				Ausgangs-pH = 3,95 (H ₂ SO ₄)				Ausgangs-pH = 3,94 (H ₃ PO ₄)			
	pH	c_d	c_s	$\frac{c_d}{c_s}$	pH	c_d	c_s	$\frac{c_d}{c_s}$	pH	c_d	c_s	$\frac{c_d}{c_s}$
39	6,00	149	142	1,05	3,90	0	0	—	3,96	0	0	—
48	6,12	382	284	1,34	3,87	16	16	1,00	3,92	0	1,5	—
62	6,11	570	457	1,25	4,04	83	65	1,28	3,98	55	45	1,22
72	6,04	522	467	1,11	4,02	46	41	1,12	3,97	58	53	1,09
135	7,55	522	446	1,17	4,72	14	17	0,82	4,25	—	4	—

Zeit h	Ausgangs-pH = 5,11 (H ₂ SO ₄)				Ausgangs-pH = 5,04 (H ₃ PO ₄)				Ausgangs-pH = 6,75 (NaOH)			
	pH	c_d	c_s	$\frac{c_d}{c_s}$	pH	c_d	c_s	$\frac{c_d}{c_s}$	pH	c_d	c_s	$\frac{c_d}{c_s}$
39	5,15	66	63	1,05	5,06	45	42	1,07	6,68	163	144	1,13
48	5,25	258	200	1,29	5,05	247	240	1,03	6,57	454	471	0,96
62	5,27	452	393	1,15	4,98	376	299	1,26	6,62	572	498	1,15
72	5,28	407	408	1,00	4,72	206	181	1,14	6,62	586	526	1,11
135	7,04	415	372	1,12	6,26	71	57	1,25	8,00	522	444	1,18

Mittelwerte aus 2 Parallelen

Einfluss zweier verschiedener Säuren und einer Lauge geprüft. Es wurde durch Zugabe von Phosphorsäure und Schwefelsäure das pH mit jeder Säure auf 4 bzw. 5 gestellt; mit Natronlauge wurde das pH auf 6,7 heraufgesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 und Fig. 30 dargestellt.

Es ist ersichtlich, dass die Zugabe von Säure einen nachteiligen Effekt auf die diastatische Aktivität ausübt, und zwar wirkt die Phosphorsäure sich in beiden Fällen (bei Ausgangs-pH 4 und 5) schlechter aus als Schwefelsäure. Vergleicht man die während der Bebrütungszeit gemessenen pH-Werte in den beiden Substraten, wo das Ausgangs-pH einerseits durch Phosphorsäure und andererseits durch Schwefelsäure eingestellt wurde, so erkennt man, dass das pH der mit Phosphorsäure eingestellten Proben weniger rasch steigt, ja sogar noch ein wenig sinkt, im Verlauf der Kulturzeit. Betrachtet man die beiden Versuche, wo das Ausgangs-pH auf 5 bis 5,1 eingestellt wurde, so sieht man, dass bis zu einer Kulturzeit von 72 Stunden das pH im Falle von Schwefelsäure von 5,11 auf 5,28 ansteigt, im Falle von Phosphorsäure von 5,04 auf 4,72 sinkt. Es ist die Frage, ob die festgestellte

verminderte Ausbeute und die rasche Aktivitätsabnahme nach Erreichung des Maximums auf diese kleine pH-Differenz oder auf die Wirkung von Sulfat- oder Phosphationen zurückzuführen ist. Man kann es eigentlich nicht unterscheiden, solange man nicht in weiteren Versuchen den speziellen Einfluss von diesen Ionen abgeklärt hat.

Bei einem Ausgangs-pH von 4 werden nur sehr kleine Ausbeuten erreicht. Es ist kein deutlicher Unterschied in der Auswirkung von Schwefelsäure verglichen mit der Auswirkung von Phosphorsäure ersichtlich.

Durch Zugabe von Natronlauge bis pH 6,75 wird kein bemerkenswerter Effekt in bezug auf Diastasebildung, verglichen mit der unbehandelten Kleie, festgestellt.

Betreffend der Verschiebung in der Zusammensetzung der Amylasekomponenten ist folgendes zu sagen: Aus dem Kurvenverlauf der dextrinogenen und saccharogenen Aktivität (Fig. 29 und 30) und aus dem Verhältnis von c_d/c_s (Tabelle 31 und 33) ist ersichtlich, dass nur geringe Verschiebungen feststellbar sind (wenigstens mit diesen Methoden). Es ist jedoch bemerkenswert, dass die Bildung der Enzymkomponenten mit saccharogener Aktivität fast in allen Fällen etwas langsamer erfolgt als die Bildung der dextrinisierenden Enzyme; meistens nimmt im Bereich der maximalen Ausbeute der Wert von c_d/c_s den höchsten Betrag an und sinkt ausserhalb dieses Bereiches wieder ein wenig. Die Formel für die Bestimmung der saccharogenen Aktivität konnte für diese Untersuchungen immer angewandt werden. Der Reaktionsmechanismus wich somit nicht stark von demjenigen der Enzyme der Standardlösung ab.

In keinen der vorhergehenden Untersuchungen wurde die Aktivität von Maltase und Grenzdextrinase verfolgt. Es wurde nur geprüft, ob diese Enzyme bei der Bestimmung der saccharogenen Aktivität wesentlich interferieren. Dabei wurde festgestellt, dass innerhalb der Reaktionszeiten, wie sie für die Bestimmung der saccharogenen Aktivität notwendig waren, keine Zunahme der Reduktionswirkung gegenüber 3,5-Dinitrosalizylsäure stattfand, wenn 10 ml des Enzymextraktes zu 20 ml einer auf pH 5,7 gepufferten Maltoselösung (2 g/l) gegeben wurden. Auf einer α -Dextrinlösung (Myrbäck, vgl. 63) von 5 g/l unter sonst gleichen Bedingungen wie für Maltose konnte gewisse Aktivität festgestellt werden. Gemessen am Extinktionswert waren es unter den betreffenden Bedingungen etwa 15% der Aktivität auf Stärkelösung. Es wurde aber nicht geprüft, ob es sich bei diesem Dextrin wirklich um ein Grenzdextrin handelt, d. h. ob es nicht auch von α -Amylase noch weiter abgebaut wird.

Gelegentlich wurde auch die spektrophotometrische Methode zur Bestimmung der dextrinogenen Aktivität in den Enzymextrakten herangezogen. Es konnte mit dieser Methode keine Änderung im Reaktionsmechanismus festgestellt werden.

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 Stärkeabbaus 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.

6. Zusammenstellung einiger oft verwendeter Symbole

c = amylytische (diastatische Aktivität)

e_d = dextrinogene Aktivität, bestimmt mit der modifizierten Wohlgemuth-Methode

e_D = dextrinogene Aktivität, bestimmt mit der spektrophotometrischen Methode

e_s = saccharogene Aktivität

t = Reaktionszeit der Enzymlösung mit dessen Substrat, in Minuten

$K = 0,00126$

$b = 0,000451$

} Konstanten zur Berechnung der saccharogenen Aktivität

M = Einwaage in g Kleie pro Kolben

W_1 = Wasserzugabe in ml zur Kleie, vor der Sterilisation

W_2 = Wasserzugabe in ml zur Kleie, nach der Sterilisation

T = Temperatur in °C

7. Literaturverzeichnis

1. Auerbach, F. und Bodländer, E., *Angew. Chemie* **36**, 602 (1923).
2. Balls, A. K., Thompson, R. R. und Walden, M. K., *J. Biol. Chem.* **163**, 571 (1946).
3. Balls, A. K., Walden, M. K. und Thompson, R. R., *J. Biol. Chem.* **173**, 9 (1948).
4. Beckord, L. D., Kneen, E. und Lewis, L. H., *Ind. Eng. Chem.* **37**, 692 (1945).
5. Bernfeld, P. und Studer-Pécha, H., *Helv.* **30**, 1895 (1947).
6. Bernfeld, P. und Studer-Pécha, H., *Helv.* **30**, 1904 (1947).
7. Bernfeld, P. und Gürtler, P., *Helv.* **31**, 106 (1948).
8. Bernfeld, P. und Fuld, M., *Helv.* **31**, 1420 (1948).
9. Bernfeld, P. und Fuld, M., *Helv.* **31**, 1423 (1948).
10. Bernfeld, P., Staub, A. und Fischer, E. H., *Helv.* **31**, 2165 (1948).
11. Bernfeld, P., *Methods in Enzymology*, hg. von Colowick, S. P. und Kaplan, N. O., Acad. Press, Inc., New York, 1955.
12. Bird, R. und Hopkins, R. H., *Biochem. J.* **56**, 86 (1954).
13. Bodansky, O., *J. Biol. Chem.* **205**, 731 (1953).
14. Brimley, R. C. und Barrett, F. C., *Practical Chromatography*, Chapman and Hall Ltd., London, 1953.
15. Drews, B., Specht, H. und Olbrich, H., *Branntweinwirtschaft* **76**, 21 (1954). ref. in *Ann. Rev. Biochem.* **24**, 215 (1955), *C. A.* **48**, 6508 c (1954).
16. Fischer, E. H. und Bernfeld, P., *Helv.* **31**, 1831 (1948).
17. Fischer, E. H. und de Montmollin, R., *Helv.* **34**, 1987 (1951).
18. Fischer, E. H. und de Montmollin, R., *Helv.* **34**, 1994 (1951).
19. Hirs, C. H. W., Moore, S. und Stein, W. H., *J. Biol. Chem.* **200**, 493 (1953).
20. Hirs, C. H. W., *J. Biol. Chem.* **205**, 93 (1953).
21. Hirs, C. H. W., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5743 (1955).
22. Hirs, C. H. W., *Methods in Enzymology*, hg. von Colowick, S. P. und Kaplan, N. O., Acad. Press, Inc., New York, 1955.
23. Hopkins, R. H., *Adv. Enzym.* **6**, 389 (1946).
24. Hopkins, R. H. und Jelinek, B., *Biochem. J.* **56**, 136, (1954).
25. Hopkins, R. H., *Rev. fermentations et inds. aliment.* **10**, 262 (1955), ref. in *C. A.* **50**, 5797 c (1956).
26. Hostettler, F., Borel, E. und Deuel, H., *Helv.* **34**, 2132 (1951).
27. Kerr, R. W., Cleveland, F. C. und Katzbeck, W. J., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 3918 (1951).
28. Kneen, E. und Beckord, L. D., *Arch. Biochem.* **10**, 41 (1946).
29. Kobayashi, T. und Yamanouchi, K., *J. Agr. Chem. Soc. (Japan)* **27**, 180 (1953).
30. Landis, Q. und Redfern, S., *Cereal Chem.* **24**, 157 (1947).
31. Landis, Q., *Cereal Chem.* **22**, 1 (1945).
32. Meeuse, B. J. D., *J. Exptl. Botany* **3**, 52 (1952).
33. Meyer, K. H., Fischer, E. H. und Bernfeld, P., *Helv.* **30**, 64 (1947).
34. Meyer, K. H., Fuld, M. und Bernfeld, P., *Experientia* **3**, 411 (1947).
35. Meyer, K. H., Bernfeld, P., Gürtler, P. und Noelting, G., *Helv.* **31**, 108 (1948).
36. Meyer, K. H. und Rathgeb, P., *Helv.* **31**, 1533 (1948).

37. Meyer, K. H., Bernfeld, P., Rathgeb, P. und Gürtler, P., *Helv.* **31**, 1536 (1948).
38. Meyer, K. H. und Rathgeb, P., *Helv.* **31**, 1545 (1948).
39. Meyer, K. H., Fischer, E. H., Staub, A. und Bernfeld, P., *Helv.* **31**, 2158 (1948).
40. Meyer, K. H. und Gonon, W. F., *Helv.* **34**, 290 (1951).
41. Meyer, K. H. und Gonon, W. F., *Helv.* **34**, 294 (1951).
42. Meyer, K. H., Fischer, E. H. und Piguët, A., *Helv.* **34**, 316 (1951).
43. Meyer, K. H., Spahr, P. F. und Fischer, E. H., *Helv.* **36**, 1924 (1953).
44. Myrbäck, K. und Örtenblad, B., *Die Methoden der Fermentforschung*, hg. von Bamann, E. und Myrbäck, K., Leipzig, 1940.
45. Myrbäck, K. und Neumüller, G., *The Enzymes*, hg. von Sumner, J. B. und Myrbäck, K., Acad. Press. Inc., New York, 1950.
46. Myrbäck, K. und Willstaedt, E., *Arkiv Kemi* **6**, 417 (1953).
47. Myrbäck, K., *Arkiv Kemi* **7**, 53 (1954).
48. Nelson, N., *J. Biol. Chem.* **153**, 375 (1944).
49. Noelting, G. und Bernfeld, P., *Helv.* **31**, 286 (1948).
50. Ohlsson, E., *C. r. trav. Lab. Carlsberg, Sér. Chim.* **16**, 7 (1926).
51. Ohlsson, E., *Z. physiol. Chem.* **189**, 17 (1930).
52. Okazaki, H., *Symposia on Enzyme Chem. (Japan)* **9**, 43 (1954).
53. Partridge, S. M., *Ion Exchange and its Applications*, Society of Chemical Industry, London, 1955.
54. Pazur, J. H., *J. Biol. Chem.* **205**, 75 (1953).
55. Pazur, J. H. und Sandstedt, R. M., *Cereal Chem.* **31**, 416 (1954).
56. Pazur, J. H. und Budowich, T., *Science* **121**, 702 (1955).
57. Peterson, E. A. und Sober, H. A., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 751 (1956).
58. Prescott, S. C. und Dunn, C. G., *Industrial Microbiology*, McGraw Hill Book Co, New York, 1949.
59. Redfern, S. und Landis, Q., *Cereal Chem.* **23**, 1 (1946).
60. Redfern, S., *Cereal Chem.* **24**, 259 (1947).
61. Roy, D. K., *Ann. Biochem. and Exptl. Med. (India)* **15**, 101 (1955). ref. C. A. **50**, 6587 f (1956).
62. Sandstedt, R. M., Kneen, E. und Blish, M. J., *Cereal Chem.* **16**, 712 (1939).
63. Schelling, C. L., *Diss. ETH, Zürich* (1952).
64. Sober, H. A., Kegeles, G. und Gutter, F. J., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 273 (1952).
65. Sober, H. A., Gutter, F. J., Wyckhoff, M. M. und Peterson, E. A., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 756 (1956).
66. Sumner, J. B., *J. Biol. Chem.* **62**, 287 (1925).
67. Stinson, E. E., *Iowa State Coll. J. Science* **29**, 509 (1955), ref. in C. A. **49**, 11755 f (1955).
68. Tauber, H. und Kleiner, J. S., *J. Biol. Chem.* **99**, 249, (1932).
69. Tauber, H., *Enzyme Chemistry and Technology*, J. Wiley & Sons Inc., New York. Chapman & Hall Ltd., London, 1949.
70. Underkofler, L. A., Severson, G. M., Goering, K. J. und Christensen, L. M., *Cereal Chem.* **24**, 1 (1947).
71. Underkofler, L. A. und Roy, D. K., *Cereal Chem.* **28**, 18 (1951).
72. Underkofler, L. A. und Hickey, R. J., *Industrial Fermentations*, Chemical Publishing Co, New York 1954.
73. Whelan, W. J., Bayly, J. M. und Roberts, P. J., *J. Chem. Soc.* **1953**, 1293.
74. Whelan, W. J. und Roberts, P. J., *J. Chem. Soc.* **1953**, 1298.
75. Willstätter, R. und Schudel, G., *Ber.* **51**, 780 (1918).
76. Wohlgemuth, J., *Biochem. Z.* **9**, 1 (1908).

CURRICULUM VITAE

von Joseph Meyrath

geboren am 9. September 1928 in Schieren, Luxemburg

In Schieren besuchte ich während sieben Jahren die Primarschule. Im „Lycée classique de Diekirch“ nahm ich während zweieinhalb Jahren am Unterricht an der „section classique“ teil. Nach Unterbruch von einem Jahr nahm ich die Ausbildung an der „section moderne“ am „Lycée classique de Diekirch“ nach dem Krieg wieder auf und schloss dort mit dem „Examen de passage“ im Jahre 1946 ab. Das „Diplôme de fin d'études secondaires“ erwarb ich im Sommer 1949 nach drei Jahren Ausbildung am „Lycée de garçons de Luxembourg, section moderne, sous-section industrielle“. Im gleichen Jahre immatrikulierte ich mich an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Abteilung für Landwirtschaft, in Zürich. Im Herbst 1953 diplomierte ich als Ingenieur-Agronom, Spezialrichtung Agrotechnologie. In den Schulferien absolvierte ich in verschiedenen Betrieben und Institutionen landwirtschaftliche und chemisch-biologische Praktika.

Von November 1953 bis Ende Juli 1955 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter für Mikrobiologie an der Eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz in Zürich tätig.

Seit August 1955 bin ich als Assistent am Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich angestellt, wo mir Gelegenheit geboten wurde, diese Promotionsarbeit auszuführen.

Gedruckt in Westdeutschland