Sz
9821a

UNTERSUCHUNGEN ZU POLYSACCHARID-SPALTENDEN ENZYMEN VON HEFEN DER ART TRICHOSPORON BEIGELII

Martin Zimmermann

C2 9221 a

Untersuchungen zu Polysaccharid-spaltenden Enzymen von Hefen der Art *Trichosporon beigelii*

Von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

BIBLIOTHEK DER TECHN. HOCHSCHULE AACHEN

Diplom-Biologe
Martin Zimmermann
aus Aachen

Referent: Universitätsprofessor Dr. Carl-Christian Emeis
Korreferent: Universitätsprofessor Dr. Winfried Hartmeier
Tag der mündlichen Prüfung: 12. 11. 1990

Meinen Eltern,
meiner Schwester,
und Ute

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Problemstellung	9
3.	Material und Methoden	10
3.1	Stämme	10
3.2	Chemikalien	10
3.3	Medien	10
3.3.1	Stammhaltung	10
3.3.2	Screening-Medien	11
3.3.3	Medium zur Amylase-Produktion	11
3.3.4	Medium zur Produktion der Mazerationsenzyme	12
3.4	Gewinnung und Analyse von Kulturfiltraten	12
3.4.1	Gewinnung von Kulturfiltraten	12
3.4.2	Konzentrierungsmethoden	12
3.4.3	Bestimmung der Proteingehalte	13
3.4.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten	13
3.4.4.1	Freisetzung reduzierender Zucker	13
3.4.4.2	Viskosimetrische Aktivitätsbestimmungen	13
3.4.4.3	Bestimmung der Pektinlyase	14
3.4.4.4	Bestimmung der Pektinesterase	14
3.4.4.5	Test auf Glycosidasen	15
3.4.4.6	Bestimmung der pH-Optima	16
3.4.4.7	Bestimmung der Temperaturoptima	16
3.4.4.8	Temperaturinaktivierungen der Enzyme	16
3.4.4.9	Substratsättigung der Enzyme	17
3.4.5	Bestimmung von Stärkegehalten	17
3.5	Methoden zur Enzymreinigung	17
3.5.1	Entsalzung und Umpufferung	17
3.5.2	Enzymreinigung durch Gelfiltration	18
3.5.3	Ionenaustauschchromatographien	20

3.5.4 Elektrophoretische Methoden 21
3.5.4.1 Isoelektrische Fokussierung 21
3.5.4.2 SDS-PAGE 22
3.5.5 Glycoproteinfärbung 22
3.6 Analyse der Mazeration 23
3.6.1 Bestimmung der Mazerationsaktivität 23
3.6.2 Freisetzung reduzierender Gruppen 24
3.6.3 Quantitative Bestimmung von Galakturonsäuren 24
3.6.4 Bestimmung von Hexosen 25
3.6.5 Dünnschichtchromatographien der Zucker 25
3.6.6 Reinigung freigesetzter Polymerer 26
3.6.7 Säure-Hydrolyse von Oligo- und Polymeren 26
3.6.8 HPLC-Bestimmungen einzelner Zucker 26
3.7 Elektrophoretische Karyotypisierung 27
3.7.1 Gewinnung der Proben 27
3.7.2 Trennung der Chromosomen 28

4. Ergebnisse 29
4.1 Screening auf Enzymbildner 29
4.2 Untersuchungen zur Amylase 32
4.2.1 Amylase-bildende Stämme 32
4.2.2 Optimierung der Kulturbedingungen 32
4.2.3 Untersuchung des Kulturfiltrats 34
4.2.3.1 Enzymaktivitäten im Kulturfiltrat 34
4.2.3.2 Bestimmung des pH-Optimums 34
4.2.3.3 Stärkeabbau und Spaltmodus 35
4.2.3.4 Temperaturoptimum und Stabilität 36
4.2.4 Reinigung der Glucoamylase 43
4.2.5 Charakterisierung der Glucoamylase 47
4.3 Untersuchung der Xylanase 50
4.3.1 Optimierung der Xylanase-Bildung 50
4.3.2 Xylanabbau durch das Kulturfiltrat 51

4.4 Untersuchung mazerierender Enzyme 53
4.4.1 Optimierung der Kultivierung 53
4.4.2 Mazerationseigenschaften des Kulturfiltrats 55
4.4.3 Untersuchung der Pektinase 61
4.4.3.1 Reinigung der Endopolygalakturonase 61
4.4.3.2 Charakterisierung der Endopolygalakturonase 65
4.4.3.3 Nachweis einer Exopektinase 71
4.4.4 Untersuchung der CMC-ase 75
4.4.4.1 Reinigung der CMC-ase 75
4.4.4.2 Charakterisierung der CMC-ase 76
4.4.5 Untersuchung der GLB-ase 77
4.4.5.1 Reinigung der GLB-ase 78
4.4.5.2 Charakterisierung der GLB-ase 79
4.4.6 Mazerationsaktivität der gereinigten Endo-PG, CMC-ase und GLB-ase 81
4.4.7 Mazeration mit inaktivierter Endo-PG 82
4.4.8 Auftrennung der mazerierenden Aktivitäten 83
4.4.9 Reinigung der Esterase 88
4.4.10 Charakterisierung der Esterase 88
4.4.11 Reinigung des Dimer-freisetzenden Enzyms 91
4.4.12 Synergistische Aktion der gereinigten Mazerationsenzyme 93
4.5 Elektrophoretischer Karyotyp 99
4.5.1 Grundlagen der Methode 99
4.5.2 Protoplastierung von T. beigelii 101
4.5.3 Parameter der Chromosomenelektrophorese 102

5. Abschlußdiskussion und Ausblick 105

6. Zusammenfassung 119

7. Literatur 120

Verzeichnis der Abkürzungen

CBS	Centraalbureau vor Schimmelcultures, Baarn, NL
CMC-ase	Carboxymethylcellulase
DC	Dünnschichtchromatographie
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen
Endo-PG	Endopolygalakturonase
GLB	Locust-Bean Gum
GLB-ase	Galaktomannanase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
kD	Kilodalton
Km-Wert	Michaelis-Menten Konstante
log	dekadischer Logarithmus
ln	natürlicher Logarithmus
MB	Megabasen
MG	Molekulargewicht
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
Rf-Wert	relative Laufstrecke
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
V	Reaktionsgeschwindigkeit
Vmax	maximale Reaktionsgeschw.
Ys-Wert	Ertragskoeffizient

1. Einleitung

Polysaccharidspaltende Enzyme werden sowohl im großtechnischen Maßstab als auch in der biochemischen Forschung eingesetzt.
Sie machen mit einer Jahresproduktion von circa 25000 Tonnen etwa 30 Prozent aller industriell produzierten Enzyme aus (GODFREY und REICHELT, Stand 1985, geschätzt).
Wichtige Enzyme sind Amylasen, Cellulasen, Pektinasen sowie in neuerer Zeit Hemicellulasen.

Amylasen werden eingesetzt, um aus Stärke bzw. stärkehaltigen Rohstoffen Glucose und Glucose-Oligomere zu gewinnen. Die Zucker können dann als Substrat für Mikroorganismen dienen, um Einzellerprotein oder Stoffwechselprodukte wie Ethanol zu gewinnen. In der Lebensmittelindustrie dienen Amylasen z.B. der Verbesserung der Backeigenschaften von Brotteig.
Für einen vollständigen Stärkeabbau muß sowohl eine Aktivität gegen α-1,4 als auch gegen α-1,6 glucosidische Bindungen vorhanden sein.
Von Mikroorganismen werden hauptsächlich die folgenden Amylasen gebildet: das Endoenzym α-Amylase (1,4-α-D-Glucan-Glucan-Hydrolase, EC 3.2.1.1) und das Exoenzym Glucoamylase (Glucan-Gluco-Hydrolase, EC 3.2.1.3).
Die Glucoamylasen unterscheiden sich unter anderem in ihrer Aktivität gegen α-1,6 glucosidische Bindungen. Während die meisten Glucoamylasen beide Bindungstypen spalten, gibt es besonders bei Hefen solche, die nur α-1,4 glucosidische Bindungen angreifen.

Cellulasen werden in der Hauptsache zur Verwertung Cellulose-haltiger Abfälle sowie der Verbesserung der Silage (GOD-

FREY und REICHELT, 1983) benötigt.
Ein vollständiger Abbau nativer Cellulose erfordert die synergistische Wirkung zweier Enzyme (WOOD und Mc CRAE, 1977): der Endoglucanase (1,4-β-D-Glucan-Glucano-Hydrolase, EC 3.2.1.4) und der Exoglucanase (1,4-β-D-Glucan-Cellobio-Hydrolase EC 3.2.1.91).

Das wichtigste Einsatzgebiet pektinolytischer Enzyme ist die Lebensmittelindustrie. Pektinase-haltige Präparate dienen zum einen der Mazeration pflanzlicher Gewebe, d.h. zur Auflösung des Gewebeverbands in einzelne Zellen und zum anderen zur Erhöhung der Saftausbeute bei der Maische, d.h. zum weitgehenden Abbau der Zellwand. Eine weiterere wesentliche Einsatzmöglichkeit ist der Abbau von Trubstoffen in Säften (ROMBOUTS und PILNICK, 1980; VORAGEN et al. 1986; WHITAKER, 1984; UHLIG, 1986).
Pektinasen gelten nach einer Vielzahl von Arbeiten als Hauptenzym der Mazeration. Diese Einschätzung beruht auf mehreren Tatsachen:
Erstens konnte die Arbeitsgruppe um ALBERSHEIM zeigen (TALMADGE et al. 1973) , daß die Mittellamelle zwischen pflanzlichen Zellen aus Pektin besteht. Der Abbau der Mittellamelle reicht aus, um die Zellen voneinander zu trennen. Die Mazeration erfordert keine vollständige Hydrolyse der Zellwand.
Zweitens gibt es viele Arbeiten, die bei der Mazeration nur einen Einfluß der Pektinase feststellen: (ULRICH, 1975; BATEMAN und MILLAR, 1975; SREENATH et al. 1986; VORAGEN et al. 1986; ISHII, 1978; Mc CLENDON, 1964; GARIBALDI und BATEMAN, 1971; EL-REFAI et al. 1987, 1988; LÖHR, 1982).
Bei technischen Enzympräparaten, wie z.B. Rohament P, ist wegen der hohen Zahl an verschiedenen Enzymen im Präparat (TABLEROS et al. 1986) nur schwer nachzuweisen, daß allein

die Pektinase die Mazeration bewirkt.

Bei Kulturfiltraten von Hefen ist die Situation einfacher: So können in gut mazerierenden Kulturfiltraten von Candida macedoniensis und von Candida/ kluyveromyces-Hybriden keine anderen Enzyme als Polygalakturonasen gefunden werden (CALL et al. 1985; KOLVENBACH, 1987; MOLITOR,Diplomarbeit, 1990). Allerdings erscheinen in diesen Arbeiten Evidenzen dafür, daß die Pektinase eventuell doch nicht alleine an der Mazeration beteiligt ist. Diese Evidenzen sind:
Erstens weichen die pH-Optima der Mazeration und der Pektinase um drei Einheiten voneinander ab;
Zweitens treten gelegentlich Kulturfiltrate mit hoher Pektinaseaktivität aber schlechter Mazeration auf;
Drittens gibt es Hefen, die Pektinasen bilden, die nicht mazerieren. So mazeriert die Pektinase von Kluyveromyces marxianus, der perfekten Form von Candida macedoniensis, nur im extrem sauren pH-Bereich.

Die Einteilung pektinolytischer Enzyme kann nach ihrem Substrat und ihrem Wirkungsmechanismus vorgenommen werden.
In dieser Arbeit wurde die von FOGARTY und WARD (1974) beschriebene Nomenklatur übernommen. Danach sind pektische Substanzen colloidale Kohlenhydrate aus Pflanzen, die einen hohen Anteil von Anhydrogalacturonsäure aufweisen. Die Carboxylgruppe der Galacturonsäure kann je nach Herkunft des Materials mehr oder weniger stark mit Methanol verestert sein. Die Galakturonsäuren liegen als α-1,4-D-Polymer vor. In Seitenketten kommen Rhamnose, Arabinose, Galaktose, Xylose und Fucose vor.
Als Protopektin bezeichnet man das wasserunlösliche Ausgangsmaterial, aus dem Pektin durch limitierte Hydrolyse freigesetzt wird. Enzyme, die diese Freisetzung bewirken,

werden Protopektinasen genannt.
Pektin bezeichnet die veresterte Form und Pektinsäure die nicht veresterte Form der wasserlöslichen Polymere.
Der enzymatische Abbau von Pektinen kann durch folgende Mechanismen erfolgen (REXOVA-BENKOVA und MARKOVIC, 1976):
Die Pektinesterase (EC 3.1.1.11) spaltet Methanol ab.
Eine hydrolytische Spaltung der α-1,4-Bindung im Pektin oder in der Pektinsäure wird durch die Endo-D-Poly-galakturonase (EC 3.2.1.15), die Exo-D-Poly-galakturonase (EC 3.2.1.67) und die D-galakturonandigalakturono Hydrolase (EC 3.2.1.82) bewirkt.
Durch β-Elimination zwischen dem C4 und C5 Atom der Galakturonsäure spalten die Endopectat-Lyase (EC 4.2.2.2), die Exopectatlyase (EC 4.2.2.9), die Oligo-D-galaktosiduronat-Lyase (EC 4.2.2.6) und die Endo-Pektin-Lyase (EC 4.2.2.10).
Die technisch bedeutendsten Enzyme sind die Pektinesterase, die Endo-D-Poly-galakturonase und die Endo-Pektin-Lyase.
Je nach Einsatzgebiet werden an das Enzympräparat unterschiedliche Anforderungen gestellt. So erfordert der Abbau von Trubstoffen in Apfelsaft wegen des hohen Veresterungsgrades des Pektins einen hohen Gehalt an Pektinesterase, während in Mazerationsenzymen, die die Zellen intakt lassen müssen, keine Pektinesterasen vorkommen sollen.

Die Hemicellulasen dienen in erster Linie der Verwertung pflanzlicher Abfälle. Durch ihren Einsatz sollen die Polymere in ihre Monomere zerlegt werden, die dann zu Einzellerprotein oder Ethanol verstoffwechselt werden. Obwohl eine große Menge von Hemicellulosen anfällt, ist der Einsatz hemicellulytischer Enzyme nicht weit verbreitet.

Als die wichtigsten und am besten untersuchten Hemicellulasen seien hier zwei der Enzyme aufgeführt, die Xylan abbau-

en: die Endoxylanase (1,4-β-D-Xylan-Xylano-Hydrolase, EC 3.2.1.8) und die Xylosidase (β-D-Xylosid-Xylo-hydrolase, EC 3.2.1.37).
Während in technischen Enzympräparaten oft eine Vielzahl verschiedener Aktivitäten nachweisbar ist (TABLEROS et al. 1986) werden in der Forschung gereinigte Enzyme eingesetzt. Mit gereinigten Enzymen können z.B. einzelne Polysaccharide in komplexen Gemischen spezifisch nachgewiesen werden (ASPINALL, 1985) .

Wichtige Produzenten von Polysaccharidasen sind Aspergillus, Trichoderma, Rhizopus und Bacillus Arten (GODFREY und REICHELT, 1983).

In den letzten Jahren wurden viele Hefen oder hefeähnliche Pilze als mögliche Produzenten von Polysaccharidasen untersucht. Ihre meistens unproblematische Fermentation sowie die Tatsache, daß bei ihnen keine Mycotoxinbildung bekannt ist, gelten als potentielle Vorteile.
Allerdings sind nur relativ wenige Arten beschrieben, die größere Mengen an Polysaccharidasen bilden.

DE MOT et al.(1984 a,b) beschreiben eine Reihe von Amylase-bildenden Hefen, von denen jedoch die wenigsten über ein Amylasesystem verfügen, das einen vollständigen Abbau der Stärke ermöglicht. Hefen, die ein komplettes Amylasesystem besitzen, sind zum Beispiel Trichosporon pullulans (DE MOT und VERACHTERT, 1986), Schwanniomyces castellii (HINTZ, 1987) , Saccharomycopsis fibuligera (DE MOT et al. 1984 a) oder Pichia burtonii (DE MOT et al. 1984 b).

Cellulytische Aktivitäten besitzen Hefen der Gattung Trichosporon (STEVENS und PAYNE, 1977; ZEMEK et al. , 1981) und

Aureobasidium pullulans (POU-LLINAS und DRIGUEZ, 1987; PIEL et al. 1990).
Ein vollständiger Abbau nativer, kristalliner Cellulose durch Enzyme aus Hefen ist bisher nur für Aureobasidium pullulans (ZEMEK et al., 1981) beschrieben worden.

Hefen mit pektinolytischen Enzymen sind unter anderen Candida macedoniensis (CALL et al. 1985), Kluyveromyces fragilis (SAKAI et al. 1984), Aureobasidium pullulans (SAKAI und TAKAOKA, 1985), Torulopsis candida, Geotrichum candidum, Trichosporon cutaneum (CALL und EMEIS, 1978), Cryptococcus (ALBERT, 1982) sowie Saccharomyces chevalieri und Candida norvegensis (SANCHEZ et al. 1984).

Xylanasen wurden bei folgenden Hefen gefunden: Aureobasidium pullulans (POU-LLINAS und DRIGUEZ, 1987; LEATHERS, 1986; DOBBERSTEIN und EMEIS, 1989), Cryptococcus albidus (BIELY et al. 1980), Trichosporon pullulans und T. cutaneum (LEE et al. 1987; STEVENS und PAYNE, 1977; HRMOVA et al. 1984; STÜTTGEN und SAHM, 1982).

Nach Literaturdaten erscheint die Hefe Trichosporon beigelii wegen eines ausgesprochen weiten Enzymspektrums als aussichtsreicher Kandidat für die Untersuchung extrazellulärer, polysaccharidspaltender Enzyme.
So zeigten CALL und EMEIS (1978) pektinolytische, GIANI et al. (1980) dextranolytische und DE MOT et al. (1984 b) amylolytische Aktivitäten zusätzlich zu den o.a. xylanolytischen und cellulolytischen Enzymen. Außer der Xylanase wurde jedoch noch keines der Enzyme gereinigt und eingehender charakterisiert.
Trichosporon beigelii bzw. sein Synonym T. cutaneum wird systematisch zu den basidiomycetalen Hefen gestellt. Ein sexu-

eller Zyklus ist unbekannt. Unter Mangelbedingungen bildet die Hefe Chlamydosporen, wachsende Kulturen zeigen Mycel und Arthrosporen (KREGER-VAN RIJ, 1984). Die Hefe wächst strikt aerob (KÄPPELI und FIECHTER, 1982) und zeichnet sich durch ein breites Substratspektrum aus. Neben einer Vielzahl von Kohlenhydraten, sowohl Monomeren (KREGER-VAN RIJ, 1984) als auch Polymeren (ZIMMERMANN und EMEIS, 1989) verwerten viele Stämme auch Phenole als Kohlenstoffquelle (SPANNING und NEUJAHR, 1986).
Bei Wachstum auf Medien mit einem starken Überschuß an Kohlenhydraten können einzelne Stämme bis zu 45 % ihrer Biomasse in Form von Lipiden anreichern (RATLEDGE, 1987). Auch bei Wachstum auf Xylan können hohe Mengen an Lipiden akkumuliert werden (FALL et al. 1984). TAHOUN et al.(1986) beschreiben die Produktion von Biomasse und Lipiden mit T. beigelii auf Molke.
Nach Untersuchungen von FIECHTER et al.(1987) lässt sich die Hefe problemlos in kontinuierlicher Kultur anziehen.
Diesen Vorteilen steht jedoch als Nachteil gegenüber, daß einzelne Stämme der Art T. cutaneum als Erreger einer oberflächlichen Erkrankung der Haare, der "white piedra" , als leicht humanpathogen eingeordnet werden. Zudem sind in den letzten Jahren invasive Infektionen mit T. cutaneum bei Patienten mit defektem oder unterdrücktem Immunsystem aufgetreten (HOY et al. 1986; WALLING et al. 1987). Es ist jedoch zu bedenken, daß von T. cutaneum über 90 Synonyma angegeben werden (KREGER-VAN RIJ, 1984). Man kann also davon ausgehen, daß nicht jeder als T. cutaneum oder T. beigelii bezeichnete Stamm pathogen ist.

Neben den klassischen Methoden der Hefesystematik wie der Bestimmung der morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften eines Stammes ist in den letzten Jah-

ren die elektrophoretische Karyotypisierung immer häufiger eingesetzt worden. Diese Methode beruht auf der gelelektrophoretischen Trennung der intakten Chromosomen. Abhängig von der Zahl und der Größe der Chromosomen entstehen stammspezifische Bandenmuster. Man erwartet, daß sich die Bandenmuster umso stärker voneinander unterscheiden, je weniger die Stämme miteinander verwandt sind (SCHWARTZ und CANTOR, 1984; CARLE und OLSEN, 1984, 1985; DE JONGE et al. 1985; MAGEE und MAGEE, 1987; ZIMMERMANN et al. 1988).
Mit Hilfe der elektrophoretischen Karyotypisierung können Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Stämmen einer Art untersucht werden. Eine derartige Analyse kann hilfreich sein, um technisch einsetzbare T. beigelii-Stämme von humanpathogenen abzugrenzen.

Zwei Einsatzgebiete für T. beigelii erscheinen nach der Literatur als besonders aussichtsreich:
Das weite Substratspektrum könnte die Hefe befähigen, pflanzliche Abfälle in Einzellerprotein und Lipide umzuwandeln und die pektinolytischen und cellulolytischen Enzyme könnten als Mazerationsenzyme Verwendung finden.

2. Problemstellung

Um zu untersuchen, ob Trichosporon beigelii zum Abbau pflanzlicher Abfälle fähig ist und ob er als Produzent mazerierender Enzyme in Frage kommt, sollten T. beigelii Stämme auf die Bildung extrazellulärer amylólytischer, cellulolytischer, hemicellulolytischer und pektinolytischer Enzyme hin überprüft werden. Dabei sollte vor allem auf die Mazerationsaktivität der Kulturfiltrate geachtet werden.
Für den oder die besten Stämme sollten die Kulturbedingungen im Hinblick auf die Enzymproduktion optimiert werden.
Die gebildeten Enzyme sollten gereinigt und charakterisiert werden. Besonderer Wert sollte dabei auf die Untersuchung derjenigen Enzyme gelegt werden, die an der Mazeration beteiligt waren.
Zur Analyse der Mazeration galt es, ein geeignetes Substrat zu finden, das es ermöglichte, die Wirkung des Enzymgemisches und der einzelnen Enzyme durch die Bestimmung der freigesetzten Reaktionsprodukte zu verfolgen. Die Analyse der Mazeration sollte ergeben, welche Enzyme an ihr beteiligt waren und was diese Enzyme bewerkstelligten.
Durch die Bestimmung des elektrophoretischen Karyotypes verschiedener T. beigelii Stämme sollte überprüft werden, wie einheitlich die Genomstrukturen innerhalb dieser Art sind.

3. Material und Methoden

3.1 Stämme

Trichosporon beigelii CBS: 2480, 2486, 2545, 5790, 5791
DSM: 70675, 70684, 70698, 70707

Trichosporon pullulans CBS: 2532

Da in der Literatur die Artnamen T. beigelii und T. cutaneum etwa gleich häufig verwandt werden, werden sie auch in dieser Arbeit beide gebraucht. Dabei wird immer die Namensgebung des jeweiligen Autors übernommen.

3.2 Chemikalien

Wenn nichts anderes vermerkt wird, wurden Chemikalien des Reinheitsgrades p.a. der Firma Fluka eingesetzt.

3.3 Medien

3.3.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung erwies sich ein Malzextrakt-Medium als gut geeignet:

1 %	Malz-Extrakt	Oxoid
0,4 %	Glucose	Maizena
o,4 %	Hefeextrakt	Oxoid
2 %	Agar	Behrens

Die Inkubation erfolgte bei 24° C.

3.3.2 Screening-Medien

Plattentest
Die Medien enthielten alternativ 1 % der folgenden Kohlenhydrate:

Xylan aus Birkenholz	Roth
Pektin A	Roth
Arabinogalaktan	Serva
Carboxymethylcellulose	Roth
Locust Bean Gum	Sigma
Stärke	

sowie

0,7	% Yeast-Nitrogen Base	Difco
0,5	% Hefeextrakt	
2	% Agar	

Der pH-Wert wurde mit Schwefelsäure bzw. Natronlauge auf 5,0; 6,0 oder 7,0 eingestellt.

Schüttelkulturen wurden auf den o.a. Medien mit einem Kulturvolumen von 20 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 20, 24, 28 und 37° C inkubiert.

3.3.3 Medium zur Amylaseproduktion

1	% Stärke	Biotechnology grade
0,5	% Ammoniumsulfat	
0,25	% Hefeextrakt	
0,1	% Kaliumdihydrogenphosphat	
0,05	% Magnesiumsulfat	
0,01	% Natriumchlorid	
0,01	% Kalziumchlorid	

in o,1 molarem Natriumphosphatpuffer, pH 6,0.

3.3.4 Medium zur Produktion der Mazerationsenzyme

1 % Locust Bean Gum Food grade Sigma
0,5 % Ammoniumsulfat
0,5 % Hefeextrakt
ebenfalls in dem o.a. aufgeführten Puffer.

Die Inkubationen erfolgten bei 24° C auf einem Rundschüttler mit 150 UPM. Es wurden 200 ml Hauptkultur in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 5 % Vorkultur angeimpft und 3-4 Tage bebrütet.

3.4 Gewinnung und Analyse von Kulturfiltraten

3.4.1 Gewinnung von Kulturfiltraten

Zur Reinigung der Enzyme wurden Kulturfiltrate auf den unter Punkt 3.3.3 und 3.3.4 aufgeführten optimierten Medien gewonnen, indem die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert wurde. Den Filtraten wurde 0,02 % Natriumazid zur Konservierung zugesetzt.

3.4.2. Konzentrierungsmethoden

Je nach Problemstellung wurden die Lösungen entweder durch Ultrafiltration oder durch Gefriertrocknung und anschließende Resuspendierung in einem geringeren Volumen konzentriert.
Gefriertrocknung: Gamma Typ 290 von Christ
Ultrafiltration: Amicon DC 2 mit H1 P10-20 Filterkartusche

3.4.3 Bestimmung der Proteingehalte

Der Proteingehalt der Kulturfiltrate und Enzymlösungen wurde nach der Methode von LOWRY (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard ermittelt.

3.4.4 Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten

3.4.4.1 Freisetzung reduzierender Zucker

Amylase, Pektinase, Carboxymethylcellulase, Galaktomannanase und Xylanase wurden quantitativ durch die Freisetzung reduzierender Gruppen aus den o.a. Substraten bestimmt.
Der Test erfolgte mit 1 %-igen Substratlösungen in Citrat-Phosphat Puffer, 0,1 molar, bei dem jeweiligen optimalen pH-Wert und bei einer Temperatur von 37° C.
Der Gehalt an reduzierenden Gruppen wurde mit der von SPIRO (1966) modifizierten NELSON-SOMOGYI Methode gemessen. Eine Somogyi-Einheit (SE) entspricht der Enzymmenge, die eine Zunahme von 1 Mikromol reduzierender Gruppen pro ml und Minute bewirkt. Die Monomeren, aus denen das jeweilige Substrat bestand, dienten als Standard für die Eichkurve.
Die Aktivität des Kulturfiltrates gegen Filterpapier,d.h. gegen kristalline Cellulose wurde nach der Methode von MANDELS (1976) bestimmt. Dabei wurde ein Streifen Filterpapier der Type Whatman 3 MM, 1*6 cm, in 1,5 ml Citrat-Phosphat-Puffer 0,1 molar, pH: 4,5 mit o,5 ml Enzymlösung bei 45 °C 60 Minuten lang inkubiert. Die dabei freigesetzten reduzierenden Zucker wurden wie oben angegeben bestimmt.

3.4.4.2 Viskosimetrische Enzymbestimmungen

Die Anwesenheit von Galaktomannanase und Carboxymethylcellu-

lase konnte qualitativ durch die deutliche Viskositätsabnahme der Substratlösung während der Reaktion bestimmt werden. Die viskosimetrische Bestimmung der Pektinase-Aktivität erfolgte in einem UBBELOHE-Kapillarviskosimeter. Es wurde die Durchlaufzeit einer Pektinsäurelösung bestimmt, die verschiedene Zeit mit der Pektinase inkubiert worden war. Als Standard dienten zum einen hitzeinaktivierte Ansätze, zum anderen eine Lösung von Monogalakturonsäure.

3.4.4.3 Bestimmung der Pektinlyase-Aktivität

Die Pektinlyase-Aktivität wurde nach FOGARTY und WARD (1974) bei einem pH-Wert von 8,0 und in Gegenwart von 25 mM Kalziumchlorid bestimmt. Der Nachweis beruht auf der Bildung einer ungesättigten C-C Bindung in der Galakturonsäure. Diese Bindung kann durch ihre Absorbtion bei 235 nm nachgewiesen werden. Als Substrat diente eine 1,5 % ige Pektin C Lösung in o,1 M NaCl.

3.4.4.4 Bestimmung der Pektinesterase-Aktivität

Pektinesterasen setzen aus verestertem Pektin Methanol frei. Dieser kann mit der unter Punkt 3.6.8. beschriebenen HPLC-Anlage nachgewiesen werden (MASSIOT et al. 1988 a).

Testablauf:
2 % Pektin B (Veresterungsgrad 72 %) in Natrium- Phosphat-Puffer, o,1 molar, pH: 5,5 lösen
Zu 2 ml Substrat 0,2 ml Enzym geben
In gasdicht verschlossenem Gefäß bei 37 °C inkubieren
Mit HPLC analysieren

Bei vollständiger Freisetzung des Methanols aus dem Pektin ist ein Methanolgehalt von ungefähr 1,5 g/l zu erwarten. Mit der HPLC-Anlage können 0,2 g/l Methanol sicher nachgewiesen werden.

Als weitere Absicherung wurde nach REXOVA-BENKOVA und MARKOVIC (1976) die Bildung freier Carboxylgruppen nach der Abspaltung des Methanols gemessen.

Testablauf
1,5 % Pektin B aus Äpfeln bzw. Pektin C aus Citrusfrüchten in 0,1 molarer NaCl-Lösung lösen
Mit NaOH einen pH-Wert von 7,0 einstellen
Zu 20 ml Substrat 2 ml Enzym bzw. Kulturfiltrat geben
Den pH-Wert kontinuierlich messen

Als Kontrolle wurden 0,5 Einheiten Pektinesterase aus Tomaten (Sigma) pro ml Ansatz eingesetzt. Bei der Kontrolle fiel der pH-Wert innerhalb von 10 Minuten um zwei Einheiten.

3.4.4.5 Test auf Glycosidasen

Die Wirkung von Glycosidasen kann durch die Spaltung synthetischer Substratanaloga nachgewiesen werden. In dem Test nach O'BRIEN und COLWELL (1987) wird als Analogon das 4-Methylumbelliferyl-Derivat des jeweiligen Zuckers eingesetzt. Bei der Spaltung entsteht Methylumbelliferon, welches durch Licht der Wellenlänge 366 nm zu einer starken blauen Fluoreszenz angeregt wird. Die Fluoreszenz kann durch Alkalisieren mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung verstärkt werden.

Testablauf
Derivat-Stammlösung der Konzentration 25 µMol/ml in Dimethylsulfoxid ansetzen
1 Volumen Stammlösung mit 20 Volumina Natriumphosphat-Puffer, 0,1 molar, pH: 5,5 mischen
5 µl Substratlösung auf Whatman 3MM Papier tropfen
5 µl Enzymlösung dazu tropfen
Papier 20 Min. bei 37 °C inkubieren
Papier unter UV-Licht, 366 nm, betrachten

3.4.4.6 Bestimmung der pH-Optima

Zur Bestimmung der für die Enzymreaktionen optimalen pH-Werte wurden die Substrate in 0,1 molaren Puffern mit den entsprechenden pH-Werten gelöst. Für den pH-Bereich von 4,0 bis 6,0 wurden Citrat-Phosphat-Puffer verwandt, für höhere pH-Werte erwies sich ein Phosphat-Puffer als geeignet. Die Aktivität wurde mit der NELSON-SOMOGYI Methode ermittelt.

3.4.4.7 Bestimmung der Temperaturoptima

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur wurde für jedes Enzym bei seinem vorher ermittelten optimalen pH-Wert überprüft. Der Test erfolgte wie oben beschrieben mit der Nelson-Somogyi Methode.

3.4.4.8 Temperaturinaktivierungen der Enzyme

Zur Überprüfung der Temperaturstabilität der Enzyme wurden diese in einem Puffer, der ihrem pH-Optimum entsprach, wäh-

rend der angegebenen Zeitdauern bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Danach wurden sie schnell abgekühlt und die Restaktivität unter optimalen Reaktionsbedingungen (siehe 3.4.4.7. und 3.4.4.8) ermittelt.

3.4.4.9 Bestimmung der Substratsättigung der Enzyme

Die jeweiligen Substrate wurden in Konzentrationen von 0,05 bis 2,0 % eingesetzt. Bei den Reaktionsbedingungen (Enzymkonzentration, Reaktionsdauer) wurde darauf geachtet, daß auch bei den niedrigen Substratkonzentrationen während der Reaktion nicht mehr als 10 % des eingesetzten Substrates verbraucht wurden. Um eine höhere Genauigkeit zu gewährleisten, wurden für jede Substratkonzentration Zeitverlaufskurven ermittelt, aus denen dann die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt wurde. Die Reaktionen wurden unter den zuvor ermittelten optimalen Bedingungen durchgeführt. Die Auswertung der Resultate wurde in der Regel nach EADEE und HOFSTEE vorgenommen, da diese Auftragung nach BISSWANGER (1979) die relativen Fehler der einzelnen Meßwerte besser berücksichtigt.

3.4.5 Bestimmung von Stärkegehalten

Um den Stärkegehalt in Kulturmedien und in den Reaktionsansätzen messen zu können, in denen Stärke als Substrat für die Amylase in Gegenwart von Glucose diente, wurde nach Ergebnissen von SPENCER-MARTINS und VAN-UDEN (1979) die Lugolfärbung der Stärke ausgenutzt.

Testablauf
0,1 ml Stärkelösung in 5 ml A. dest geben
0,1 ml Lugol/ A. Dest-Mischung, 1:1, dazu geben, mischen
Messung der Extinktion bei 525 nm Wellenlänge

Der Test verläuft linear bei Stärkekonzentrationen (Stärke nach Zulkowski von Fluka) bis 10 mg/ml und wird nicht durch hohe Glucosekonzentrationen gestört.

3.5 Methoden zur Enzymreinigung

3.5.1 Entsalzung und Umpufferung

Volumina von 1 bis 30 ml wurden durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 entsalzt oder umgepuffert (PORATH und FLODIN, 1959). Die Chromatographien wurden bei kleinen Probenvolumina auf einer käuflichen PD 9-Säule von PHARMACIA und bei größeren Volumina auf einer Glassäule mit einem Säulenvolumen von 300 ml durchgeführt. Beide Säulen wurden mit einem hydrostatischen Druck von einer Säulenlänge betrieben. Bei optimaler Ausnutzung der Säulenkapazität werden Wiederfindungsraten von 90 % bei einer Probenverdünnung auf das 1,5 fache des Ausgangsvolumens erreicht. Nähere Informationen entnehme man der Produktbeschreibung von PHARMACIA.

3.5.2 Enzymreinigung durch Gelfiltration

Zur Trennung und Molekulargewichtsbestimmung der Enzyme durch Gelfiltrationschromatographie dienten zwei Säulen mit unterschiedlichem Trennbereich.

1. AcA 44 Säule

Gel:	Ultrogel AcA 44 von LKB
Säule:	LKB 2137, 1,6 cm Durchmesser, 97 cm Länge
Trennbereich:	MG: 10000-130000 Dalton
Elutionsmittel:	0,1 molarer Natriumphosphat-Puffer, pH: 5,5 mit o,1 molar NaCl
Probenvolumen:	1-5 ml
Durchfluß:	10 ml/h

2. Sephadex G 75 Säule

Gel:	Sephadex G 75, Medium von Sigma
Säule:	Glas mit 2,4 cm Durchmesser, 79 cm Länge
Trennbereich:	MG: 5000-70000 Dalton
Elutionsmittel:	0,1 molarer Natriumphosphat-Puffer, pH: 5,5
Probenvolumen:	10-15 ml
Durchfluß:	20 ml/h

Beide Säulen wurden mit folgenden Geräten betrieben:

Pumpe:	ISMATEC IPN
Detektor:	2138 Uvicord UV von LKB
Schreiber:	Servogor
Fraktionssammler:	Microcol TDC 80 von Gilson

Zur Auswertung wurden die K_{av}-Werte der Substanzen über dem Log. ihres Molekulargewichtes aufgetragen(Whitaker, 1963). Das Elutionsvolumen von Blau-Dextran ergab das Ausschlußvolumen der Säule, das von Tryptophan das Totalvolumen. Die Berechnung der K_{av}-Werte erfolgte nach der folgenden Beziehung:

$$K_{av} = V_P - V_A / V_T - V_A$$

mit: V_P als dem Elutionsvolumen zu analysierenden Substanz
V_T als dem Totalvolumen der Säule
V_A als dem Ausschlußvolumen der Säule.

Folgende Substanzen dienten als Molekulargewichtstandards:

Blau-Dextran	MG:	2000000	Dalton
Aldolase	MG:	160000	"
BSA-Dimer	MG:	132000	"
BSA-Monomer	MG:	66000	"
Ovalbumin	MG:	46000	"
Carbonic-Anhydrase	MG:	29000	"
Chymotrypsin	MG:	25000	"
Cytochrom C	MG:	12300	"
Tryptophan	MG:	204	"

3.5.3 Ionenaustauschchromatographien der Enzyme

Als Ionenaustauscher dienten Carboxymethyl-Sephadex A 50 und DEAE-Sephadex A 25, beide von SIGMA, sowie Carboxymethyl-Cellulose 52 und DEAE-Cellulose 23 von SERVA. Die Ionenaustauscher wurden wie vom Hersteller vorgeschrieben vorbereitet (Handbuch von PHARMACIA bzw. Katalog von SERVA).
Die Trennung erfolgte in Glassäulen mit einem Gelvolumen von 20 ml.
Um die Verluste an Probe möglichst gering zu halten, wurde generell versucht, die Bindungskapazität des Austauschers vollständig auszunutzen.
Als Elutionspuffer wurden für die Kationaustauscher 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH: 6,0 eingesetzt, die Anionenaustauscher wurden mit Tris/HCl-Puffer, 50 mM, pH: 8,3 betrieben. Die Proben wurden durch Gelfiltration in diese Elutionspuffer umgepuffert.
Zur Elution der gebundenen Proteine wurden lineare NaCl-Gradienten von 0 bis 1 molar in den o.a. Elutionspuffern angelegt. Der Durchfluß wurde auf 30 ml/h eingestellt.
Als Detektor und Fraktionssammler dienten die o.a. Geräte.

3.5.4 Elektrophoretische Methoden

3.5.4.1 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung trennt Proteine nach ihrem apparenten isoelektrischen Punkt. Auf Grund ihres hohen Auflösungsvermögens ist sie ein sehr gutes Kriterium zur Bestimmung der Reinheit eines Proteins(RIGHETTI, 1983).
Die Kenntnis des IEPs eines Enzymes ermöglicht wertvolle Rückschlüsse auf die geeigneten Bedingungen zur Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie.
Eingesetzte Geräte:

Trennkammer	FBE 3000	von Pharmacia
Netzgerät	Power Supply ECPS	von LKB

Zur IEF wurden Servalyt Precotes des Trennbereichs pH: 3 bis 10 nach Angaben des Herstellers benutzt. Während des Laufs wurden die Gele auf 4° C gekühlt.
Als IEP-Standard dienten das Proteingemisch 3-9, Cellulase Onozuka und Ancistrodesmus Venom, (alle von SERVA). Der Standard wurde mit Serva-Blau nach Betriebsanleitung gefärbt.
Als Probe wurden bei enzymspezifischen Färbungen 1 SE aufgetragen, bei Proteinfärbungen 1-2 Mikrogramm.
Die Proteine der Kulturfiltrate wurden nach der Vorschrift von HEUKESHOVEN und DERNICK (1983) mit Silber gefärbt.
Die enzymspezifische Färbung der Pektinasen erfolgte nach CALL (1980) in der optimierten Form von JACOBS (1987).
Der spezifische Nachweis der Amylase wurde der Arbeit von HINTZ (1987) entnommen.

BIBLIOTHEK
TECHN. HOCHSCH.
AACHEN

3.5.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamidgelen erlaubt neben der Kontrolle der Reinheit eines Proteins eine Bestimmung seines Molekulargewichtes. In Gegenwart des Detergenz Natrium-dodecyl-sulfat wird die eigene Ladung des Proteins überdeckt und das Protein wird denaturiert. Dadurch ist die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins nur noch von seiner Größe abhängig.
Die hier beschriebene Form der SDS-PAGE ist eine DISK-Elektrophorese. Im Sammelgel werden die mit SDS beladenen Proteine durch Isotachophorese konzentriert.
Die Zusammensetzung der Gele und der Puffer entsprechen dem System von LAEMMLI (1970). Die Gele wiesen einen Vernetzungsgrad von 12,5 % T und 2,5 % C auf.
Die Gele waren 17 cm breit, 10 cm lang und 1 mm dick.
Die vertikale Trennkammer war von der Werkstatt der biologischen Institute gebaut worden.
Pro Bahn wurden 0,5 bis 1 µg Protein aufgetragen.
Die Proteine wurden mit Silber nach MORRISSEY (1981) gefärbt.
Als Molekulargewichtsmarker diente der Low Molecular Weight Calibration Kit 14-70 von SIGMA.
Zur Auswertung wurden die R_F-Werte der Proteine über dem Logarithmus ihres Molekulargewichts aufgetragen.

3.5.5 Glycoproteinfärbung

Protein wurde auf Nitrocellulose (BA 85, SCHLEICHER und SCHUELL) aufgetropft und nach der Methode von HAWKES (1982) mit Concanavalin A gefärbt.

3.6 Analyse der Mazeration

3.6.1 Bestimmung der Mazerationsaktivität

Als Maß für die Mazerationsaktivität der Kulturfiltrate und der gereinigten Enzyme diente das Volumen an Zellen, das aus einem Möhren- oder Apfelgewebe von den Enzymen freigesetzt wurde. Der Test wurde aus der Arbeit von KOLVENBACH (1987) übernommen.

Testablauf
3 g Möhren- oder Apfelstücke, 5*5*5 mm groß, in 10 ml Puffer suspendieren
2 ml Enzym zugeben
Bei 150 UPM und 37 °C für 2 Stunden inkubieren
Den Überstand mit den Zellen in ein graduiertes Reagenzglas überführen
Volumen der sedimentierten Zellen pro 10 ml Überstand nach 1 Stunde bestimmen

Zusätzlich zum Volumen der freigesetzten Zellen wurde in vielen Fällen die Gewichtsabnahme der Gewebestücke ermittelt.
Als Vergleich diente eine Lösung des käuflichen Präparates Rohament P der Firma Röhm, Darmstadt, welches in einer Konzentration von 10 mg/ml im Test eingesetzt wurde. Die Aktivität der gereinigten Enzyme wird als Prozentsatz der Aktivität des Kulturfiltrates angegeben, aus dem sie gereinigt wurden.

3.6.2 Freisetzung reduzierender Gruppen

Um reduzierende Gruppen in Mazerationsansätzen messen zu können, mußte ein Präparat hergestellt werden, das nur noch wenige freie Zucker enthielt. Um dies zu erreichen, wurden Äpfel bzw. Möhren in einem handelsüblichen, mechanischen Entsafter gründlich zerkleinert und der Saft durch Zentrifugation entfernt. Das Pellet wurde solange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis weniger als 50 µg pro ml reduzierende Gruppen mit dem NELSON-SOMOGYI Test nachweisbar waren. Das Apfelpräparat wurde in feuchter Form mit Natriumazid konserviert, das Präparat aus Möhren wurde getrocknet. Ein Gramm des Apfelpräparates wies ein Trockengewicht von 26 mg auf. Im Test wurde 1g Apfelpräparat 2 mal mit dem gewünschten Puffer gewaschen und in einem Volumen von 2 ml eingesetzt. Das Möhrenpräparat wurde im Test mit 10 mg/ml verwendet. Nach der Inkubation mit dem Enzym oder Kulturfiltrat wurden die freigesetzten Zucker mit der NELSON-SOMOGYI Methode, dem Carbazoltest (3.6.3) und der Anthron-reaktion (3.6.4) quantifiziert und/oder durch Dünnschichtchromatographie (3.6.5) und HPLC (3.6.8) analysiert.

3.6.3 Quantitative Bestimmung von Galakturonsäuren

Galakturonsäure und ihre Polymeren wurden mit dem Carbazoltest nach BITTER und MUIR (1962), übernommen aus dem Lehrbuch von CHAPLIN und KENNEDY (1986) bestimmt.

3.6.4 Bestimmung von Hexosen

Zur Bestimmung freigesetzter Hexosepolymere nach der Mazeration wurde die Anthron-Methode nach ROE (1955) angewendet.

3.6.5 Dünnschichtchromatographie der Zucker

Die Zucker-Monomere und Oligomere, die bei den Reaktionen frei wurden, konnten mit zwei dünnschichtchromatographischen Verfahren identifiziert werden.
Bei beiden Verfahren wurden die Platten vor Gebrauch 30 Minuten bei 110 °C aktiviert. Es wurden jeweils 5-10 µg Zucker aufgetragen. Die Zucker wurden durch Ansprühen mit dem Naphtoresorcin/ Schwefelsäure-Reagenz und Erhitzen der Platten auf 110 °C detektiert. Der Vergleich ihrer Laufstrecke und ihrer Färbung mit denen parallel aufgetragener Standards ermöglichte die Identifizierung der Zucker (STAHL, 1967).

Tabelle 1: Bedingungen zur DC der Zucker

Zucker	Platte	Laufmittel	Marker
Monomere	Kieselgel 60 mit Na-Phosphat pH: 5; 0,1 M	Aceton : 5 Butanol: 4 Wasser : 1	Monomeren- Marker 1, 2 Oligomere
Oligomere	Kieselgel 60	Formiat: 3 Butanol: 2 Wasser : 1	Oligomeren- Marker

Monomeren-Marker 1: Rhamnose, Xylose, Mannose, Galaktose und Galakturonsäure.
Monomeren-Marker 2: Arabinose, Glucose und Cellobiose.
Oligomeren-Marker : Glucose, Maltose und Maltotriose.

3.6.6 Reinigung von freigesetzten Polymeren

Durch die Einwirkung der gereinigten Esterase auf das Apfelpräparat wurden lösliche Polymere freigesetzt. Um diese näher untersuchen zu können, wurden sie durch 3-malige Fällung mit 2 Volumenteilen eiskaltem Ethanol aus dem Überstand des Ansatzes gereinigt.

3.6.7 Säure-Hydrolyse von Zucker-Oligomeren und Polymeren

Die saure Hydrolyse der Zucker geschah in Gegenwart von 0,1 N Schwefelsäure bei 110° C in einem verschließbaren Zentrifugenglas über Nacht. Danach wurden die Ansätze neutralisiert und durch Dünnschichtchromatographie und/oder HPLC analysiert.

3.6.8 HPLC-Bestimmungen einzelner Zucker

Die Trennung und Quantifizierung bestimmter Zucker gelang durch HPLC. Folgendes System erwies sich als geeignet:

Pumpe:	Gynkotek 300 B	
Säulenofen:	Jones Chromatography	
Refraktometer:	LCD 201	von Melz
Integrator:	C-R 1 B	von Shimadzu
Säule:	Aminex HPX 87 H	von Biorad
Laufmittel:	0,015 N Schwefelsäure	
Durchfluß:	0,5 ml/Min	
Temperatur:	65° C	
Probe:	20 µl	

3.7 Elektrophoretische Karyotypisierung

3.7.1 Gewinnung der Proben

Zur Gewinnung der intakten chromosomalen DNA mußten die Zellen zunächst protoplastiert werden.

Ablauf
Zellen bis zur frühen logarithmischen Phase in Vollmedium kultivieren
Zellen aus 100 ml Kultur in A. dest waschen
Zellen in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH: 6,0 waschen
Zellen in dem o.a. Puffer mit 0,5 M KCl waschen
Zellen in 5 ml Lösung mit je 10 mg/ml Novozym G 234, Novoflex und α-Amylase (SERVA) in dem o.a. stabilisierten Puffer suspendieren
Bei 37 °C für 60 Minuten inkubieren
Protoplasten in 0,3 M KCl waschen und schonend abzentrifugieren
Protoplasten mit 3 ml 1 % LM-Agarose, gelöst in 0,125 M EDTA, pH: 7,5 mischen

Die Proteine und RNA wurden enzymatisch entfernt (ZIMMERMANN et al. , 1988).

3.7.2 Trennung der Chromosomen

Zur Trennung der Chromosomen diente die Pulsaphor-Kammer mit hexagonaler Elektrodenanordnung der Firma PHARMACIA. Die Trennbedingungen werden bei den Ergebnissen angegeben.
Als Marker fungierten Chromosomen von Saccharomyces cerevisiae und Schizosaccharomyces pombe, die von der Firma BIOZYM

bezogen wurden.
Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (5 µg/ml) gefärbt, über Nacht entfärbt und im UV-Durchlicht (254 nm) fotografiert.

4. Ergebnisse

4.1 Screening auf Enzymbildner

Im Plattentest wurden die unter Punkt 3.1 aufgeführten Trichosporon beigelii Stämme auf die Verwertung von Stärke, Pektin, Xylan, Locust-Bean Gum und Arabinogalaktan als Kohlenstoffquelle hin getestet.
Die Ausschleusung xylanolytischer Enzyme konnte an der Bildung klarer Höfe um die Kolonie herum erkannt werden, pektinolytische und amylolytische Aktivitäten waren auf den Platten sichtbar, wenn diese mit eiskaltem Ethanol bzw. Lugolscher Lösung überschichtet wurden.
Die Stämme,die im Plattentest Enzyme bildeten, wurden in Schüttelkultur angezogen, um die Enzymbildung zu quantifizieren.
Da alle Stämme auf einem Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle und 0,5 % Hefeextrakt sowie 0,7 % Yeast-Nitrogen Base als Stickstoff-, Mineralien-, Vitamin- und Spurenelementquelle gut wuchsen, wurden diese Zusätze beibehalten.
Der pH-Wert des Mediums und die Anzuchttemperatur wurden variiert, um etwaigen unterschiedlichen Ansprüchen der Stämme Rechnung zu tragen.
In den Fällen, wo keine Enzymbildung nachweisbar war, konnte somit mit hinreichender Sicherheit angenommen werden, daß der Stamm nicht zur Produktion des gesuchten Enzyms fähig ist.
Die Stämme CBS 2486, 5791 sowie DSM 70675 bildeten im Plattentest keine Enzyme.
Xylanase, Amylase, Pektinase und CMC-ase wurden von den Stämmen CBS 2480, 2545 und DSM 70684, 70698 und 70707 nur in geringen Mengen (weniger als 0,5 SE/ml) in Schüttelkultur gebildet.

Einzig Stamm CBS 5790 zeigte eine deutlich bessere Aktivität. Er bildete zudem als einziger eine Galaktomannanase (GLB-ase).
Tabelle 2 zeigt für Stamm 5790 die Bildung extrazellulärer Enzyme in Schüttelkultur in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle. Die Medien enthielten 0,7 % Yeast-Nitrogen Base und 0,5 % Hefeextrakt sowie 1 % Kohlenstoffquelle.

Tabelle 2: Enzymbildung von Stamm 5790 in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle
Die Enzymaktivitäten sind in SE/ml angegeben.

	Stärke	Xylan	Pektin	GLB	Glucose
Amylase	6,0	0,5	0,0	0,1	2,0
Xylanase	0,4	4,0	0,5	0,4	0,0
Pektinase	0,5	4,5	6,0	6,5	2,3
CMC-ase	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0
GLB-ase	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0

Stamm 5790 wies somit von allen untersuchten Stämmen das breiteste Enzymspektrum und die höchsten Aktivitäten auf.
Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Miczka (Diplomarbeit, 1986), die bei einem Screening auf Xylanase-Bildung ebenfalls die beste Enzymbildung bei Stamm 5790 fand.

Die auf Xylan, Pektin und Galaktomannan als C-Quelle erhaltenen Kulturfiltrate wiesen zudem eine gute Mazerationsaktivität gegen Möhren- und Apfelgewebe auf.
Es wurden bis zu 30 % der Mazerationsaktivität von Rohament P erreicht.

Während des gesamten Screenings konnten bei keinem Stamm Arabanasen, Galaktanasen oder Aktivitäten gegen Arabinogalaktan gefunden werden.
Die Höhe der extrazellulären Aktivitäten, besonders auch die der Mazerationsaktivität, reichte für eine Reinigung und Charakterisierung der Enzyme aus. Aus diesem Grund war es nicht nötig, daß Screening fortzusetzen.

Im Vergleich zu typischen Hefen wie Kluyveromyces marxianus und Saccharomyces cerevisiae bildet T. beigelii viele Polysaccharidasen.
Der Stamm ähnelt in Bezug auf seine extrazellulären Enzyme eher dem hefeähnlichen Pilz Aureobasidium pullulans, für den ebenfalls die Bildung extracellulärer xylanolytischer, amylolytischer, pektinolytischer und cellulolytischer Enzyme beschrieben ist (DOBBERSTEIN und EMEIS, 1990; LEATHERS, 1986; PIEL et al. 1990).

Da bei der Verwertung pflanzlicher Abfälle Amylasen und Xylanasen von erheblicher Bedeutung sind, wurden zunächst diese beiden Enzyme näher untersucht. Im Anschluß daran wurden die Mazerationsenzyme analysiert.

4.2. Untersuchungen zur Amylase

4.2.1. Amylase-bildende Stämme

Aus den anfänglichen Screeningversuchen gingen die folgenden Stämme als Amylase-bildner hervor: DSM 70698, 70707, 70684 und CBS 2545, 2480 und 5790.
Stamm 5790 wurde weiter untersucht, da er die beste Enzymbildung zeigte.

Im Rahmen der folgenden Untersuchungen wurden zunächst die Kulturbedingungen optimiert. Die für einen technischen Einsatz relevanten Parameter wie der Spaltmodus der Amylase, Nebenaktivitäten, Temperatur- und pH-Optimum und die Stabilität des Enzymes wurden für ein entsalztes Kulturfiltrat bestimmt. Durch eine Abfolge von Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration wurde die Amylase bis zur Homogenität in der SDS-PAGE und der IEF gereinigt. Die derart gereinigte Amylase wurde weiter charakterisiert.

4.2.2 Optimierung der Kulturbedingungen

In einer Reihe von Versuchen wurden der pH des Mediums, die Temperatur, die Kohlenstoff-, Stickstoff- und Vitaminquelle und das Kultur- und Animpfvolumen variiert.

Das optimierte Medium enthielt:
1% Stärke, 0,5 % Ammoniumsulfat, 0,25% Hefeextrakt, 0,1% Kaliumdihydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und je 0,01% Natriumchlorid und Kalziumchlorid in einem 0,1 M Natriumphosphat-puffer, pH: 6,0.

Die beste Kultivierungstemperatur betrug 24° C.
200 ml Kultur wurden in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml Vorkultur angeimpft und mit einer Schüttelrate von 150 UPM 3 Tage inkubiert.

Nach der Optimierung bildete der Stamm 6-8 SE/ml Amylase.

Das Maximum der Enzymkonzentration wurde nach 48-52 Stunden erreicht und blieb längere Zeit konstant.

In allen Kulturen wurde die Stärke nicht vollständig abgebaut, sondern die Lugolfärbung des Kulturmediums ergab einen Gehalt von 0,1 % Stärke gegen Ende der Fermentation. Dies deutete darauf hin, daß die Amylase nicht zu einer vollständigen Stärkeverzuckerung fähig ist.

Auf Glucose wurden in der Schüttelkultur bis zu 2 SE/ml Amylase gebildet, die Enzymbildung wurde also nicht allein durch Substratinduktion reguliert. Auf Locust-Bean Gum als C-Quelle lag die Enzymproduktion mit weniger als 0,2 SE/ml deutlich niedriger, obwohl das Wachstum und die Bildung anderer Enzyme auf diesem Medium optimal verliefen.

Der Zusatz von Hefeextrakt, die Stickstoffquelle sowie die Belüftung wirkten sich stark auf die Amylasebildung aus. Die Temperatur, der pH-Wert des Kulturmediums und das Animpfvolumen hatten nur einen geringeren Einfluß. Der Hefeextraktzusatz konnte nicht ersetzt werden.
Wie später gezeigt wird, hängen auch die Bildung der Xylanase sowie die Mazerationsaktivität stark vom Hefeextraktzusatz ab, während z.B. die Pektinase bereits bei 10-fach niedrigerer Hefeextraktmenge fast optimal gebildet wird (siehe Kapitel 4.3 und 4.4).

4.2.3 Untersuchung des Kulturfiltrats

4.2.3.1 Enzymaktivitäten im Kulturfiltrat

Im Folgenden wurden nun die technisch relevanten Eigenschaften des Kulturfiltrates (KF) bestimmt. Dazu wurde das KF durch Lyophilisation konzentriert und über Sephadex G25 entsalzt. Es wies danach die folgenden Aktivitäten auf:

Amylase:	6,0 SE/ml
Carboxymethylcellulase:	0,8 SE/ml
Pektinase:	0,5 SE/ml
Xylanase:	0,4 SE/ml

4.2.3.2 Bestimmung des pH-Optimums

Als Voraussetzung für weitere Versuche wurde das pH-Optimum der Amylase ermittelt; es liegt bei einem pH-Wert von 5,5.

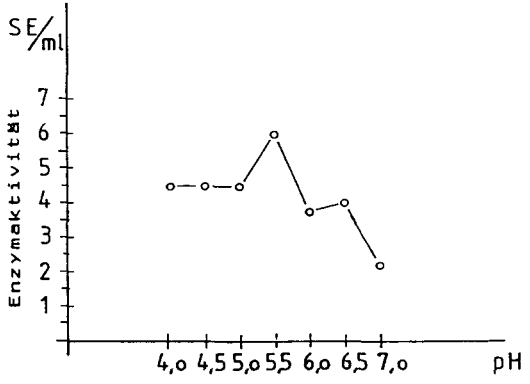


Abbildung 1: pH-Optimum der Amylase auf Stärke

Im pH-Optimum wurde die Stärke bis auf 0,1 % abgebaut.

4.2.3.3 Stärkeabbau und Spaltmodus

Im Lochplattentest auf Stärke mit dem Kulturfiltrat von Stamm 5790 traten bei der Lugolfärbung rosa gefärbte Abbauhöfe auf, während nach Einwirkung eines Kulturfiltrates von Trichosporon pullulans klare Höfe entstanden. Trichosporon pullulans produziert nach DE MOT und VERACHTERT (1986) Amylasen, die einen vollständigen Stärkeabbau ermöglichen. Dieses Ergebnis wurde als weiteres Indiz für einen unvollständigen Stärkeabbau durch das Enzym von T. beigelii gewertet.

Das Kulturfiltrat hatte die folgenden Aktivitäten gegen verschiedene α 1-4 und 1-6 Glucosepolymere:

Tabelle 3 : Aktivität des Kulturfiltrates gegen verschiedene α-Glucane

Substrat	Bindungstyp	Enzymaktivität
Stärke	α-1,4 und 1,6	6,0 SE/ml
Amylose	nur α-1,4	7,5 SE/ml
Amylopektin	α-1,4 und 1,6	1,5 SE/ml
Pullulan	α-1,4-1,4-1,6	0,2 SE/ml
Dextran	nur α-1,6	0,0 SE/ml

Das Kulturfiltrat zeigte des weiteren keine meßbare Aktivität gegen die unlösliche Blaustärke des Phadebas-Reagenz. Dieses Reagenz ist nach Untersuchungen von MARCINIAK und KULA (1982) ein spezifisches Substrat für α-Amylasen. Diese Ergebnis sprach dafür, daß keine α-Amylase vorhanden war.

Das Kulturfiltrat setzte aus Stärke nur Glucose als Reaktionsprodukt frei, wie dünnschichtchromatographische Trennungen von Reaktionsansätzen nach verschiedenen Inkubationsdauern zeigten.
Die Zeitverlaufskurve der Glucosefreisetzung aus Stärke verlief bis zu einem Umsatz von 30 % der eingesetzten Stärke linear.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das Kulturfiltrat an Amylasen ausschließlich Glucoamylasen mit Aktivität gegen α-1,4 glucosidische Bindungen enthielt.

4.2.3.4 Temperaturoptimum und Stabilität

Als nächstes wurde der Einfluß der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Amylase bestimmt. Abbildung 2 zeigt ein Optimum von 45 °C. Das Optimum wurde für eine Reaktionsdauer von 10 Minuten bestimmt. Generell gilt, daß ein umso höheres Temperaturoptimum gemessen wird, je kürzer die Reaktionsdauer gewählt wird. Dies beruht darauf, daß sich bei kürzeren Reaktionsdauern die Enzyminaktivierung geringer auf das Meßergebnis auswirkt als bei längeren. Aus diesem Grund gilt die Aktivierungsenergie als besser vergleichbare Größe (HARTMEIER, 1986). Aus dem ARRHENIUS-Diagramm resultiert eine Aktivierungsenergie von 37 KJ/Mol.
Das Temperaturoptimumskurve ist außergewöhnlich breit, da das Enzym bei einer Temperatur von 20 °C über der optimalen Temperatur immer noch 40 % der maximalen Aktivität besitzt.
Zur genaueren Untersuchung wurden Temperaturinaktivierungsversuche unternommen.

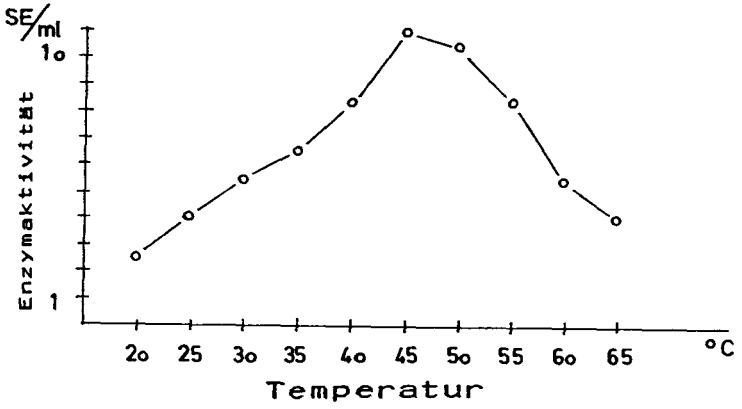


Abbildung 2: Temperaturoptimum der Amylase auf Stärke

Die temperaturinduzierte Inaktivierung eines Enzyms kann kinetisch als Reaktion erster Ordnung beschrieben werden. Dies bedeutet, daß die Aktivität bei einer bestimmten Temperatur nach folgender Beziehung abnimmt.

$$A_t = A_o * e^{kt}$$

Die logarithmische Auftragung der Aktivität über der Zeit (Inkubationsdauer des Enzyms bei einer konstanten Temperatur) sollte also eine Gerade ergeben. Die Steigung dieser Geraden ergibt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k, die selbst wieder nach ARRHENIUS von der Temperatur abhängt. Aus der Auftragung der Konstanten k nach ARRHENIUS ergibt sich dann die Aktivierungsenergie für die Inaktivierung des Enzyms.

Das Kulturfiltrat verhielt sich jedoch anders als erwartet. Abbildung 3 zeigt die Inaktivierung bei 50; 55; 57,5; 60 und 65 °C.

Die Kurve für 57,5° C zeigt deutlich, daß nach dem erwarteten linearen Abfall die Amylase-Aktivität konstant bleibt. Der ln-Wert von 0,59 entspricht einer Restaktivität von 1,8 SE/ml.

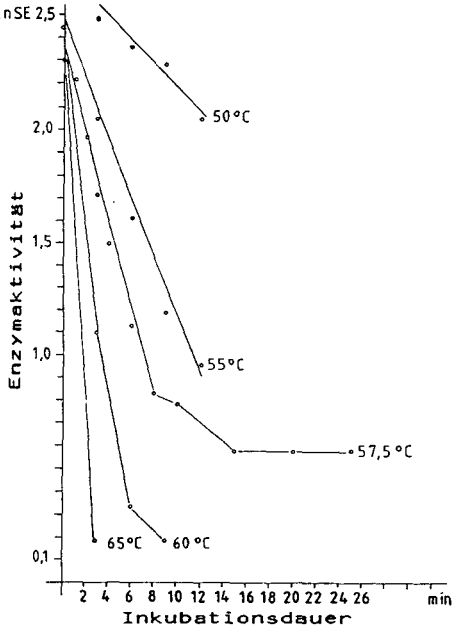


Abbildung 3: Temperaturinaktivierung der Amylase

Aufgetragen ist der ln der verbliebenen Aktivität über der Inkubationsdauer bei der angegebenen Temperatur

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß im Kulturfiltrat zwei Amylase-Aktivitäten mit unterschiedlicher Temperaturstabilität vorlagen.

Aus dem linken, linear abfallenden Teil der Auftragungen wurden die Konstanten k für die Inaktivierung der anscheinend thermolabileren Aktivität ermittelt (LING and LUND, 1978). Deren Auftragung nach ARRHENIUS (Abbildung 4) zeigte eine Aktivierungsenergie von 167 KJ/Mol.
Diese Vorgehensweise war nur möglich, weil sich beide Aktivitäten in ihrer Temperaturstabilität deutlich unterscheiden. Für die Meßwerte in dem linearen Bereich konnte deshalb davon ausgegangen werden, daß sie alleine die Inaktivierung der labileren Aktivität repräsentierten.

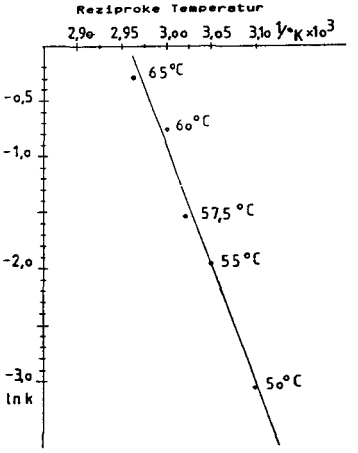


Abbildung 4: ARRHENIUS-Diagramm der Amylase-Inaktivierung
Die aus Abbildung 3 folgenden k-Werte für die Inaktivierung sind logarithmisch über dem Kehrwert der jeweiligen Inaktivierungstemperatur (angegeben in Kelvin) aufgetragen.

Durch Inkubation einer Probe bei 57,5 °C für 45 Minuten wurde die labile Aktivität vollständig inaktiviert, während die

stabilere erhalten blieb.

Die Eigenschaften dieser so erhaltenen thermostabilen Form wurden mit denen des ursprünglichen Kulturfiltrats verglichen. Es traten keine meßbaren Unterschiede auf.
Der Km-Wert war unverändert, das pH-Optimum blieb gleich und auch der Spaltmodus änderte sich nicht.
Allein das Temperaturoptimum (Abbildung 5) war mit 70 °C deutlich erhöht, die Aktivierungsenergie blieb jedoch konstant.

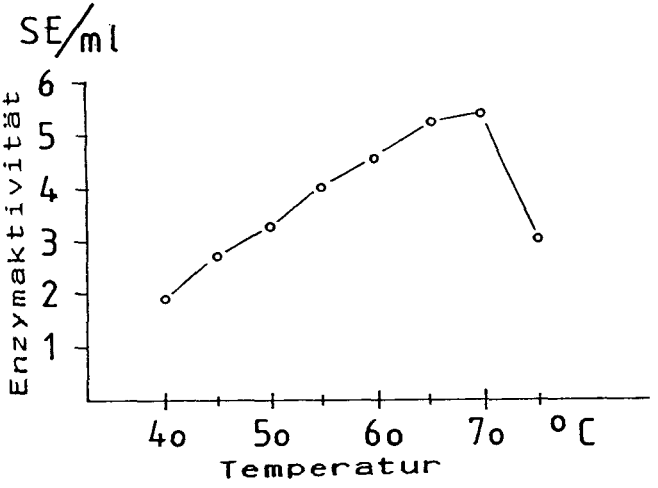
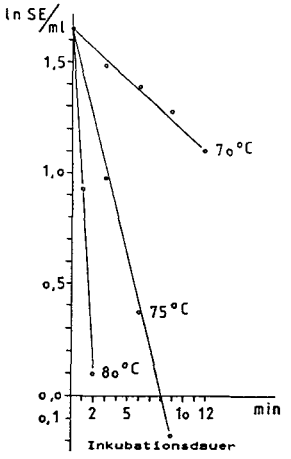


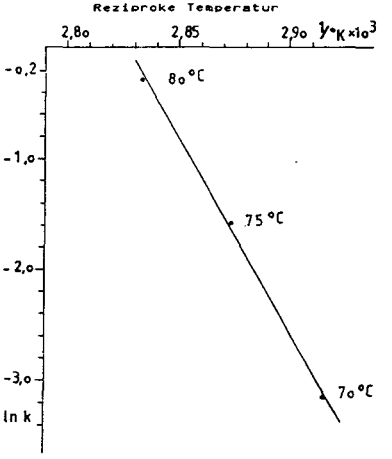
Abbildung 5: Temperaturoptimum der temperaturstabileren Form der Amylase

Inaktivierungsversuche bei 70, 75 und 80 °C resultierten in der erwarteten linearen Abnahme (Abbildung 6) und einer Aktivierungsenergie von 289 KJ/Mol (Abbildung 7).



Es ist der ln der verbliebenen Aktivität über der Inkubationsdauer bei der angegebenen Temperatur aufgetragen

Abbildung 6: Temperaturinaktivierung der stabileren Amylase



Die aus Abbildung 6 folgenden k-Werte sind logarithmisch über der reziproken Temperatur aufgetragen

Abbildung 7: ARRHENIUS-Diagramm der Temperaturinaktivierung

Die Temperaturinaktivierung der Glucoamylase folgte also einer zweistufigen Inaktivierungskurve. Eine mathematische Analyse solcher Kurven ist von DAGYS et al. (1984) beschrieben worden. Hier sei nur die Ausgangsgleichung erwähnt:

$$A_t = A_1 * e^{k1t} + A_2 * e^{k2t}$$

Dabei bezeichnen 1 und 2 die Ausgangsaktivitäten bzw. die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zweier Enzymfraktionen unterschiedlicher Aktivität und Stabilität.
Aus diesen Resultaten kann im Vergleich mit Ergebnissen von EATON und ZIMMERMANN (1976), die drei Maltasen mit unterschiedlicher Thermostabilität bei Saccharomyces cerevisiae fanden, geschlossen werden, daß die Glucoamylase in Form mindestens zweier Isoenzyme vorlag, die sich durch ihre Temperaturstabilität unterscheiden.
Diese Isoenzyme zeigten in der Gelfiltration an Sephadex G 75 und an Ultrogel AcA 44 gleiches Elutionsverhalten, was auf ähnliche Molekulargewichte hindeutete.
Zwei weitere Möglichkeiten kamen in Betracht:
1.) daß es sich um zwei verschiedene katalytische Zentren eines Proteins handelte, die unterschiedlich inaktiviert wurden,
2.) daß ein Protein durch eine Temperaturerhöhung seine Eigenschaft änderte, indem es aus einer aktiven, aber thermolabilen Konformation in eine weniger aktive, aber stabilere Konformation überging.
Gegen beide Annahmen sprach die Tatsache, daß die Aktivierungsenergie und die Affinität zum Substrat nicht verändert wurden.
In einer isoelektrischen Fokussierung der Amylase zeigten sich mehrere Aktivitätsbanden (Abbildung 8), was ebenfalls dafür sprach, daß mehrere Isoenzyme vorlagen.

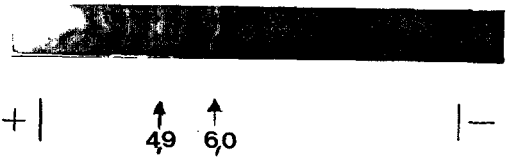


Abbildung 8: IEF der Amylase

Aktivitätsfärbung eines Gels nach isoelektrischer Fokussierung der Amylase. Die Pfeile bezeichnen die Amylasebanden mit den zugehörigen IEP-Werten.

4.2.4 Reinigung der Glucoamylase

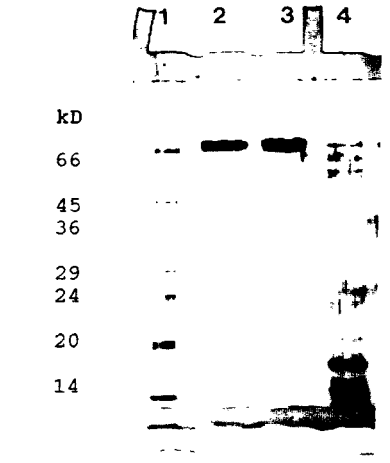
Zur Reinigung wurde die Glucoamylase durch Gefriertrocknung konzentriert, über Sephadex G 25 entsalzt und über eine Ionenaustauschersäule gegeben.
Die Ionenaustauschchromatographie wurde an DEAE-Sephadex in einem 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH: 7,0 durchgeführt. Die Hauptmenge des Enzyms wurde nicht gebunden.
Nach einer anschließenden Konzentrierung und einer Gelfiltration über die AcA 44 Säule war das Enzym nach den elektrophoretischen Kriterien rein. Tabelle 4 gibt den Ablauf der Reinigung wieder.

Tabelle 4: Reinigung der Glucoamylase

Reinigungsschritt	Spez. Aktivität	Ausbeute
Konzentrierung	11 SE/mg	75 %
Entsalzung	15 SE/mg	66 %
DEAE-Sephadex	21 SE/mg	30 %
Gelfiltration	33 SE/mg	25 %

Die Konzentrierung durch Gefriertrocknung und die Chromatographie an DEAE-Sephadex führten zu deutlichen Verlusten, die Ausbeute von 25 % bei einem Reinigungsfaktor von 3 reichte allerdings zu einer weiteren Charakterisierung.

Die Reinheit des Enzyms wurde durch SDS-Page und IEF überprüft. Wie Abbildung 9 zeigt, ergab das Enzym in der SDS-Page nur eine Bande, auch wenn es in einer 10 fach höheren Konzentration als das ungereinigte Kulturfiltrat aufgetragen wurde.
In der IEF (Abbildung 10) trat in der Proteinfärbung ebenfalls nur eine Bande auf.
Die Aktivitätsbande mit einem IEP von 4,9, die im ungereinigten Kulturfiltrat sichtbar war, fehlte in der gereinigten Glucoamylase.
Da, wie Abbildung 11 zeigt, bei der Gelfiltration nur ein Amylase-Peak zu beobachten war, muß die Trennung beider Isoenzyme bei der Ionenaustauschchromatographie stattgefunden haben. Es ist zudem wahrscheinlich, daß ein saures Protein bei einem pH-Wert von 7,0 an einen Anionenaustauscher bindet. Daß das Enzym dann nach der Elution im Salzgradienten nicht gefunden wurde, kann auf eine Denaturierung zurückzuführen sein.



Bahn 1: Marker
Bahn 2: Glucoamylase
Bahn 3: Glucoamylase
Bahn 4: Kulturfiltrat

Abbildung 9: SDS-PAGE der Glucoamylase



Bahnen 1, 2 und 3: Glucoamylase

Bahnen 4, 5 und 6: Marker

Abbildung 10: IEF der gereinigten Glucoamylase

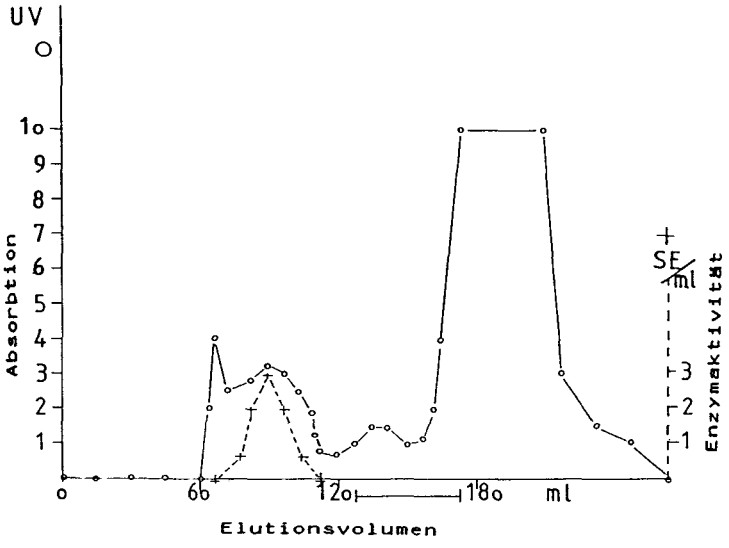


Abbildung 11: Elution der Glucoamylase an der ACA 44 Säule

Aufgetragen sind die UV-Absorbtion sowie die Amylaseaktivität über dem Elutionsvolumen. In dem unten mit dem Balken markierten Bereich eluieren die Pektinase, Xylanase und CMC-ase.

4.2.5 Charakterisierung der gereinigten Glucoamylase

Der K_m-Wert der Glucoamylase auf Stärke (Abbildung 12) betrug o,6 mg/ml, was nicht von dem des Kulturfiltrats abwich.

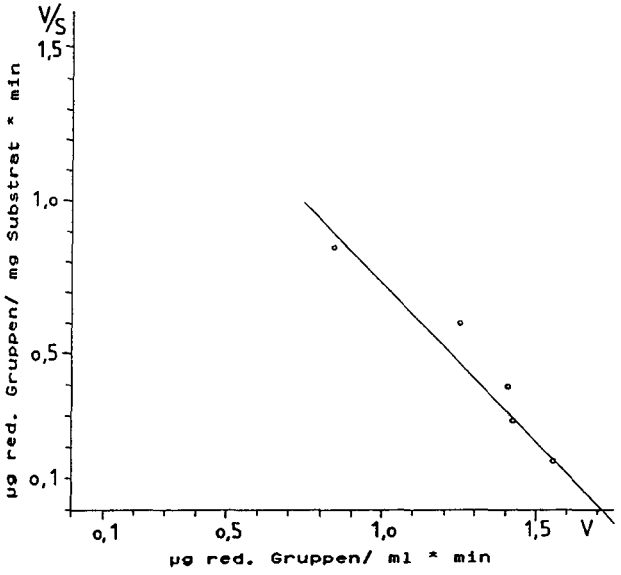


Abbildung 12: Bestimmung des K_m der gereinigten Glucoamylase auf Stärke in der Auftragung nach EADEE-HOFSTEE

Das Temperaturoptimum betrug 45 °C, die Inaktivierung bei 57,5 °C verlief vollständig.
Es war also offensichtlich die thermolabilere Form aufgereinigt worden. Die Tatsache, daß es gelang, die beiden Formen zu trennen, sprach dafür, daß es sich um zwei Proteine und nicht um verschiedene katalytische Zentren oder Zustände eines Proteins handelte.
Da in der IEF der gereinigten Glucoamylase nur eine Bande

auftrat, liegt die Vermutung nahe, daß die bei der Reinigung entfernte Bande bei einem IEP von 4,9 das Isoenzym mit der höheren Temperaturstabilität darstellte. Diese Vermutung muß allerdings durch eine Reinigung des Isoenzyms bewiesen werden.

Sowohl das Kulturfiltrat als auch das gereinigte Enzym bauen Stärke zu ca. 90 % ab. Dies ist nur möglich, wenn das Enzym nicht nennenswert von Glucose, seinem Endprodukt gehemmt wird.
Die quantitative Bestimmung der Amylaseaktivität in Gegenwart von Glucose konnte nicht durch Messung der Freisetzung zusätzlicher Glucose erfolgen, da dies sehr genaue Differenzbildungen erfordert hätte. In Anlehnung an Ergebnisse von SPENCER-MARTINS und VAN UDEN (1979) wurde die Abnahme der Lugol-Färbung der Stärke als Maß für die Enzymaktivität bestimmt. Vorversuche zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen der Glucosefreisetzung und der Abnahme der Stärkekonzentration bis zu einem Umsatz von 30 % der eingesetzten Stärke.
Auch in Gegenwart von 5 % Glucose im Ansatz nahm die Stärkekonzentration noch mit 80 % der Geschwindigkeit ab, die in den Kontrollansätzen ohne Glucose erreicht wurde. Eine ausgeprägte Endprodukthemmung liegt somit nicht vor.

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte in der DC ergab, daß Maltose gar nicht und Maltotriose nur langsam abgebaut wurden.

Gereinigte Glucoamylase wurde auf Nitrozellulose aufgetropft und durch Reaktion mit Concanavalin A und einer nachfolgenden Enzymreaktion gefärbt. Dies zeigte, daß es sich um ein Glycoprotein handelt.

Aus der SDS-PAGE folgte ein Molekulargewicht von 70000 kD, was mit der Bestimmung an der AcA 44 Säule von 67000 kD gut übereinstimmte.
Diese Tatsache spricht dafür, daß die Glucoamylase nicht aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist.

T. beigelii Stamm 5790 bildet nach diesen Ergebnissen zwei Glucoamylasen mit unterschiedlicher Temperaturstabilität, unterschiedlichem IEP aber gleichen übrigen biochemischen Eigenschaften. Die Form mit der geringeren Temperaturstabilität liegt in größerer Menge vor. Sie wurde gereinigt und charakterisiert.
Durch die Temperaturinaktivierung der labileren Form war es möglich, auch die stabilere Form alleine zu untersuchen.

4.3 Untersuchung der Xylanase

Xylanolytische Enzyme sind bei der Verwertung pflanzlicher Abfälle wegen des hohen Anteils von Hemicellulosen von großer Bedeutung. Zudem können sie einen positiven Einfluß auf die Mazerationsaktivität von Pektinasen haben (DOBBERSTEIN und EMEIS, 1989).
Für einen vollständigen Xylanabbau sind neben der Xylanase und der Xylosidase weitere, sogenannte Debranching-Enzyme notwendig, die Substituenten wie Arabinose, Methylglucuronsäure oder Acetat abspalten (BIELY, 1985).
Bis 1987 galt, daß Hefen keine Debranching-Enzyme produzieren (LEE et al. 1987). Diese Autoren beschrieben dann eine Acetylxylanesterase aus Rhodutorula mucilaginosa. DOBBERSTEIN konnte zeigen, daß Aureobasidium pullulans eine Arabinofuranosidase bildet, der Nachweis erfolgte allerdings mit dem Nitrophenylderivat des Zuckers und nicht über die Freisetzung von Arabinose aus Xylan (DOBBERSTEIN, pers. Mitteilung).
Aus diesen Gründen wurde ein Kulturfiltrat mit hoher Xylanaseaktivität auf seine Mazerationsaktivität und seine Fähigkeit, Xylan vollständig abzubauen, hin untersucht. Es galt festzustellen, ob neben der Endo-Xylanase und der Xylosidase auch Debranching-Enzyme wie die α-Arabinofuranosidase vorhanden sind.
Von den Ergebnissen der Mazerationsteste und der Versuche zum Xylanabbau sollte abhängen, ob die beteiligten Enzyme gereinigt wurden.

4.3.1 Optimierung der Xylanase-Bildung

Zur Enzymbildung war es nötig, die Hefe auf Xylan anzuziehen. Auf Xylose wurde nur sehr geringe Enzymbildung beobach-

tet. Dieses Ergebniß widerspricht den Erfahrungen mit der Xylanase von Aureobasidium pullulans, die auch auf Xylose optimal gebildet wird (DOBBERSTEIN, 1990; POU-LLINAS und DRIGUEZ, 1987) .
Auch STÜTTGEN (1981) erhielt mit einen T. cutaneum Stamm beim Wachstum auf Xylose eine, wenn auch deutlich geringere Xylanase-Bildung. Man muß jedoch bedenken, daß zwischen dem von ihm verwendeten Stamm DSM 70698 und dem hier untersuchten Stamm Unterschiede bestehen.
Des weiteren erwies sich der Zusatz einer hohen Hefeextraktmenge von 0,5 % als notwendig. Bei geringerem Hefeextraktgehalt nahm die Xylanase-Bildung bis auf ein Viertel des Maximalwertes ab.

Nach der Optimierung wurden zwischen 3,5 und 4,5 SE/ml Xylanase und 4,5 SE/ml Pektinase im Kulturfiltrat erhalten.

Auf Xylan wurde ein Y_s-Wert von 0,45 erreicht, was dafür spricht, daß die Hefe das Xylan effektiv in Biomasse umsetzt.

4.3.2 Xylanabbau durch das Kulturfiltrat

Birkenholzxylan wurde mit dem Kulturfiltrat unter optimalen Reaktionsbedingungen, d.h. einem pH-Wert von 5,5 und einer Temperatur von 40 °C inkubiert.
Zu den an Abbildung 13 angegebenen Zeiten wurden Proben gezogen und durch dünnschichtchromatographische Trennung der freigesetzten Monomere und Oligomere analysiert. Eine säurehydrolytische Spaltung des Substrats hatte einen deutlichen Arabinose-Anteil demonstriert (DOBBERSTEIN, pers. Mitteilung).

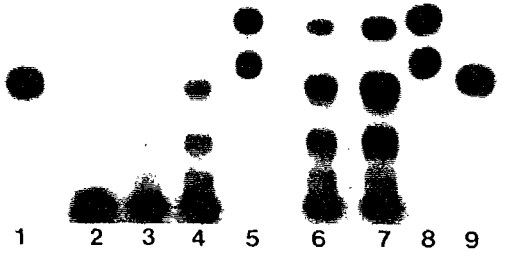


Abbildung 13: Monomeren-DC des Abbaus von Birkenholzxylan
Bahnen 1 und 9: Xylobiose; Bahnen 5 und 8: Xylose und Arabinose; Bahnen 2, 3, 4, 6 und 7: Xylan mit Kulturfiltrat nach 0, 15, 30, 60 und 480 Minuten Inkubation.

Aus der Abbildung geht hervor, daß auch bei langer Inkubation keine Arabinose nachweisbar ist. Andere xylanolytische Enzyme als Endoxylanase und Xylosidase, die zusätzlich noch durch die Reaktion mit Methylumbelliferyl-xylosid nachgewiesen wurde, traten also nicht auf.
Auch ein Test auf Arabinofuranosidase mit Methylumbelliferyl-Arabinofuranosid als Substrat verlief negativ.
Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von STÜTTGEN (1981), der bei dem Stamm DSM 70698 ebenfalls keine Arabinosefreisetzung messen konnte.

Die Mazerationsaktivität der Xylan-Kulturfiltrate war trotz des fast identischen Gehalts an Pektinasen der Aktivität der auf Locust-Bean Gum erhaltenen unterlegen. Aus diesem Grund wurden zur Analyse der Mazerationsenzyme Kulturfiltrate mit Locust-Bean Gum als Kohlenstoffquelle hergestellt. Auf eine Reinigung der Xylanase wurde verzichtet.

4.4 Untersuchung mazerierender Enzyme

4.4.1 Optimierung der Kultivierung

Wie oben bereits ausgeführt, bildete Stamm 5790 Kulturfiltrate mit guter Mazerationsaktivität. Bei der Optimierung der Anzuchtparameter wurde neben der Mazerationsaktivität die Pektinaseaktivität bestimmt, da diese nach der vorliegenden Literatur (siehe Einleitung) als das wesentliche Mazerationsenzym gilt.

Das Medium mit der optimalen Mazerationsaktivität enthielt: 1 % Locust-Bean Gum, 0,5 % Ammoniumsulfat und 0,5 % Hefeextrakt in 0,1 molarem Natriumphosphat-Puffer, pH: 6,0.

Neben Pektinase, CMC-ase und GLB-ase enthielten die Kulturfiltrate u.a. α-Galaktosidase, β-Mannosidase und eine Esterase.

Kulturfiltrate auf diesem Medium erreichten 35 % der Aktivität einer Rohament P Lösung mit 10 mg /ml.

Bereits bei den Optimierungsversuchen fiel auf, daß die Pektinase nicht alleine für die Mazeration verantwortlich sein konnte. Dies fiel besonders bei der Optimierung des Hefeextraktgehaltes auf (Tabelle 5). Die Erhöhung des Hefeextraktgehaltes führte zu einer Verdoppelung der Mazerationsaktivität (gemessen an der Zellfreisetzung aus Möhren), ohne daß die Pektinase-Aktivität signifikant gesteigert wurde.

Tabelle 5: Einfluß der Hefeextraktkonzentration auf die Bildung der Pektinase, der CMC-ase und der Mazerationsaktivität

Hefe-extrakt	CMC-ase SE/ml	Pektinase SE/ml	Mazerationsaktivität ml Zellen aus Möhren
0,05 %	0,8	5,9	0,7
0,5 %	1,2	6,1	1,4

Bei der Mazeration von Äpfeln trat ein analoges Ergebnis auf.

Die Esterase, α-Galaktosidase und β-Mannosidase waren nur in dem Kulturfiltrat mit hoher Hefeextraktkonzentration nachweisbar. Die CMC-ase wurde gesteigert. Eines oder mehrere dieser Enzyme konnten somit ebenfalls an der Mazeration beteiligt sein.

4.4.2 Mazerationseigenschaften des Kulturfiltrats

Um weitere Untersuchungen zu ermöglichen, wurde als erstes das pH-Optimum der Mazeration ermittelt. Nach Abbildung 14 hat das Kulturfiltrat zwischen einem pH-Wert von 4,5 und 6,0 hohe Aktivität, sowohl auf Apfel wie auch auf Möhren.

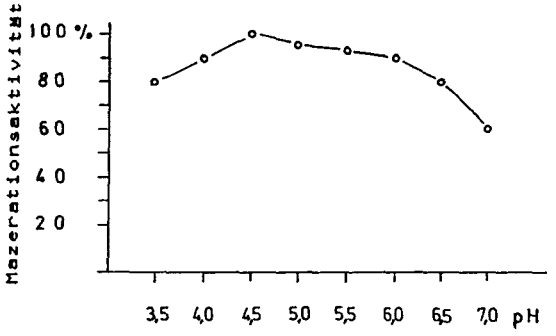


Abbildung 14: pH-Optimum der Mazeration durch Kulturfiltrat

Die Bestimmung der während der Reaktion freigesetzten Zucker bot eine Möglichkeit, die Mazerationsenzyme zu analysieren. Dazu wurde das Möhrenzellwandpräparat mit nicht weiter gereinigtem Kulturfiltrat abgebaut und die freigesetzten Zucker durch Oligomeren- und Monomeren- DC aufgetrennt.
In der Oligomeren-DC (Abbildung 15) erkennt man, daß neben Mono- und Oligomeren hauptsächlich ein dimerer Zucker entstand.



Spur 1: Nullwert
ohne KF
Spur 2: Probe
Spur 3: Marker

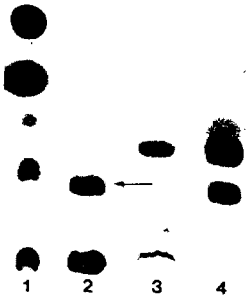
1 2 3

Abbildung 15: Oligomeren-DC des Abbaus von Möhrenzellwänden

In der Monomeren-DC (Abbildung 16) wird sichtbar, das außer dem Dimeren noch Galakturonsäure freigesetzt wurde.

Das Dimer verhielt sich in seinem Laufverhalten und seiner Färbung wie ein Dimer aus Glucose. Um dieses zu überprüfen wurde durch Ethanolfällung die Oligomere und Polymere aus dem Ansatz entfernt und der Überstand, der nur noch die Monomeren, Dimeren und geringe Mengen an Trimeren enthielt, durch Säure hydrolysiert. Nach der Hydrolyse war der Dimer-Fleck fast vollständig verschwunden und ein starker Glucose-Fleck trat auf. Neben der Glucose traten noch geringe Mengen Galakturonsäure und Rhamnose auf (Abbildung 16).
Die mit Ethanol gefällten Oligo-und Polymere wurden ebenfalls hydrolysiert (Abbildung 17). Sie enthielten Rhamnose, Xylose, viel Arabinose, Galaktose und Galakturonsäure. Damit entsprach ihre Zusammensetzung der eines typischen Pektins

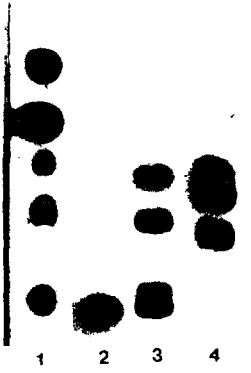
aus Möhren (MASSIOT et al. 1988 a,b).



Spur 1: Marker 1
Spur 2: Überstand des Möhrenabbaus
Spur 3: Hydrolyse des Dimeren
Spur 4: Marker 2

Der Pfeil markiert das Dimer

Abbildung 16: Monomeren DC des Abbaus von Möhrenzellwänden und Hydrolyseprodukte des Dimeren



Spur 1: Marker 1
Spur 2: Polymere aus Möhrenabbau
Spur 3: Hydrolyse der Polymeren
Spur 4: Marker 2

Abbildung 17: Hydrolyseprodukte von freigesetzten Polymeren aus Möhrenzellwänden

Eine Monomeren-DC der Abbauprodukte des Apfelpräparates mit Kulturfiltrat zeigte, daß in der Hauptsache die gleichen

Zucker freigesetzt wurden wie aus den Möhrenzellwänden.(Abbildung 18). Dies war ein Indiz dafür, daß beide Testsubstrate von denselben Enzymen angegriffen wurden.



Spur 1: Marker 1 mit
Rhamnose, Xylose
Mannose, Galaktose
Galakturonsäure
Spur 2: Apfelabbau
Spur 3: Möhrenabbau
Spur 4: Marker 2 mit
Arabinose, Glucose
Cellobiose

Abbildung 18: DC der aus Apfel und Möhre freigesetzten Zucker

Aus dem Apfelpräparat wurden, wie aus dem Möhrenpräparat Galakturonsäure und ein Zucker freigesetzt, der sich wie ein neutraler, dimerer Zucker verhielt.

Um die Kinetik der Zucker-Freisetzung zu untersuchen, wurde ein Zeitverlauf der Wirkung des Kulturfiltrates auf das Möhrenpräparat aufgenommen. Das Präparat wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml eingesetzt. Die Pektinasekonzentration betrug 6 SE/ml im Ansatz. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben gezogen, filtriert und auf reduzierende Gruppen sowie durch HPLC auf den Gehalt an Dimer analysiert.

Tabelle 6 gibt die Zunahme der reduzierenden Gruppen sowie die Zunahme des Dimeren wieder.

Tabelle 6: Zeitverlauf der Zuckerfreisetzung aus Möhren

Zeit	red. Gruppen µg/ml	Dimer µg/ml	Anteil des Dimer % Zuckerzunahme
0 Min	200	0	
10 Min	520	200	60 %
20 Min	1200	600	60 %
40 Min	1400	700	58 %
20 Std	4000	1200	31 %

Die rasche Freisetzung des Dimeren deutet darauf hin, daß es sich bei dem Enzym, das die Freisetzung bewirkt, um ein wichtiges Mazerationsenzym in dem Kulturfiltrat handelt.
Eine Pektinase ist aller Wahrscheinlichkeit nach nicht in der Lage, einen neutralen, dimeren Zucker freizusetzen. MOLITOR (Diplomarbeit, 1990) fand nach Einsatz einer Pektinase aus einem Kluyveromyces-Hybriden bei dem Abbau des Möhrenzellwandpräparates nur Galakturonsäuren und keine neutralen Zucker.

Mit dem Apfel-und dem Möhrenpräparat waren somit zwei Testsubstrate vorhanden, mit denen die Wirkung der mazerierenden Enzyme verfolgt werden konnte.
Über die Wirkung der Enzyme war bekannt:
Erstens wurde ein Glucose-Dimer freigesetzt.
Zweitens wurden Oligomere und Polymere gebildet, die wie Pektine zusammengesetzt waren.
Die Enzyme, die dies bewirkten, galt es zu reinigen.

Zur Charakterisierung der Mazerationsenzyme wurde wie folgt vorgegangen:
Die an der Mazeration beteiligte Pektinase sowie die CMC-ase und die Galaktomannanase wurden gereinigt und charakterisiert.
Sodann wurde untersucht, ob die gereinigten Enzyme alleine oder in definierten Mischungen die gleichen Mazerationseigenschaften zeigen wie das Kulturfiltrat.
Auf diesen Ergebnissen aufbauend konnten zwei weitere Enzyme gereinigt werden, die bei der Mazeration mitwirkten.
Eines dieser Enzyme wurde als Protopektinase identifiziert, das andere als dasjenige, das den dimeren Zucker freisetzte.

Da sich bei den folgenden Versuchen die Pektinase als wichtiges Mazerationsenzym erwies, wird ihre Reinigung und Charakterisierung ausführlich dargestellt.
Für die CMC-ase und die GLB-ase konnte kein Einfluß auf die Mazeration gezeigt werden. Im Interesse einer kompakten Darstellung werden deshalb ihre Reinigung und Charakterisierung in tabellarischer Form wiedergegeben.

4.4.3 Untersuchung der Pektinasen

4.4.3.1 Reinigung der Endopolygalakturonase

Eine Isoelektrische Fokussierungen zeigt, daß die Hauptbande der Pektinase einen IEP von 9,5 hat (Abbildung 19). Zudem treten neben dieser Bande nur drei weitere, sehr schwache Banden auf. Sie unterscheidet sich damit deutlich von Pektinasen anderer Hefen, so z.B. Candida macedoniensis.



Abbildung 19: IEF der Pektinasen von Candida macedoniensis und T. beigelii nach Aktivitätsfärbung

Der hohe IEP-Wert der Hauptbande ermöglichte eine Chromatographie an einem Kationenaustauscher als erstem Reinigungsschritt. Als zweiter Schritt folgte eine Gelfiltration über die AcA 44 Säule.
Ein Kulturfiltrat wurde durch Ultrafiltration auf das 10-fache konzentriert, entsalzt und die Pektinase nach folgendem Schema gereinigt (Tabelle 7)

Tabelle 7: Reinigung der Pektinase

Reinigungs schritt	Spezifische Aktivität SE/mg	Ausbeute %
Kulturfiltrat	24	100
Konzentrat	51	92
Fraktionen nach CM-Sephadex	250	69
Fraktionen nach AcA 44-Säule	320	58

Die Pektinase wurde mit einem Reinigungsfaktor 13 und einer Ausbeute von 58 % von allen Fremdaktivitäten gereinigt. Das Elutionsdiagramm der Ionenaustauschchromatographie zeigt (Abbildung 20), daß nur ein geringer Teil des Proteins an den Austauscher band.

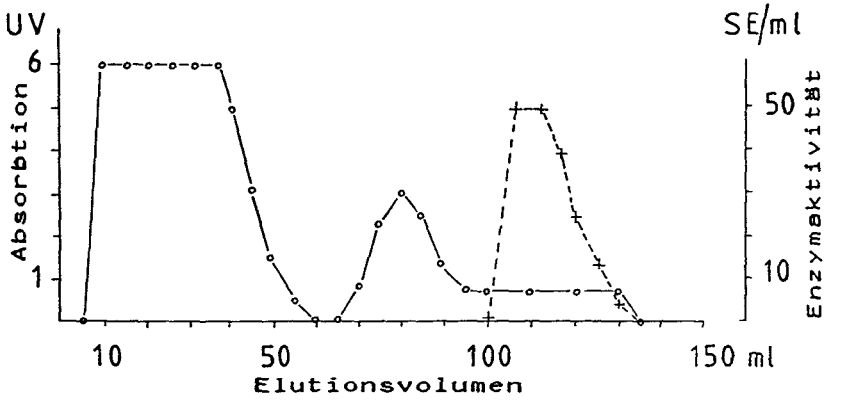


Abbildung 20: Elutionsdiagramm der Ionenaustausch-chromatographie der Pektinase
0= UV-Absorbtion, += Pektinase,

In dem Bereich von 5 bis 55 ml Elutionsvolumen eluierte das nicht gebundene Protein.
Bei einer Ionenstärke von 0,1 M NaCl eluierte mit einem Elutionsvolumen von 65 bis 95 ml eine Esterase.
Die Pektinase eluierte bei einer Ionenstärke von 0,25 M NaCl mit einem Elutionsvolumen von 100 bis 130 ml.
Die CMC-ase und die GLB-ase wurden nicht an den Ionenaustauscher gebunden.
Die Chromatographie an der AcA-Säule mußte in Gegenwart von 0,1 M NaCl in dem Puffer durchgeführt werden, da die Pektinase sonst unspezifisch an das Gel adsorbiert wurde und somit später eluierte. Die Pektinase absorbiert nur sehr schlecht UV-Licht von 280 nm Wellenlänge. Dieser Effekt erschwerte die weiteren Chromatographien erheblich, da immer alle Fraktionen auf Aktivität hin überprüft werden mußten.

Die Reinheit der Pektinase wurde durch SDS-PAGE und IEF überprüft. Es gilt in vielen Veröffentlichungen als hinreichendes Kriterium für die Reinheit eines Proteins, wenn in einer SDS-PAGE nur eine Bande auftritt. Da jedoch die IEF des Kulturfiltrates gezeigt hatte, daß mehrere, möglicherweise in ihren Eigenschaften unterschiedliche, Pektinasen nachweisbar waren, wurde die IEF als zusätzliches Kriterium notwendig.
Abbildung 21 zeigt die SDS-PAGE der Pektinase und der Esterase, Abbildung 22 die IEF der Pektinase in einem Vergleich der Protein- und der Aktivitätsfärbung.
Auch nach dem hochauflösenden Kriterium der IEF war die Pektinase rein. Die drei schwachen Banden im leicht sauren pH-Bereich waren nicht mehr vorhanden.



Bahn 1: Esterase
Bahn 2: Pektinase
Bahn 3: Kulturfiltrat
Bahn 4: Marker

Kilodalton

-66
-45
-36
-29
-24
-20
-14

Abbildung 21: SDS-PAGE der Esterase, Pektinase und des Kulturfiltrates

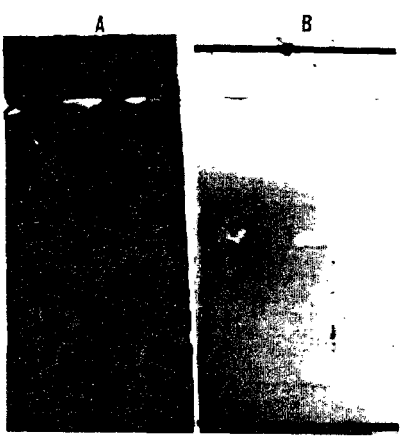


Abbildung 22: Aktivitätsfärbung (A) und Proteinfärbung (B) der Pektinase nach IEF

4.4.3.2 Charakterisierung der Endopolygalakturonase

Reaktionskinetische Daten

Als Voraussetzung für die weiteren Versuche wurden zuerst das pH-Optimum (Abbildung 23) und das Temperaturoptimum (Abbildung 24) für die Reaktion auf Pektinsäure bestimmt.

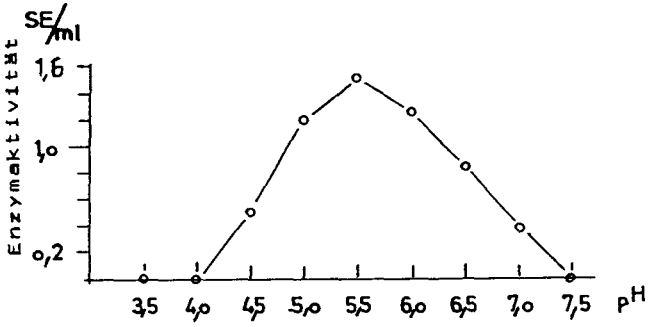


Abbildung 23: pH-Optimum der Endo-PG auf Pektinsäure

Man erkennt ein pH-Optimum bei einem Wert von 5,5. Das Enzym hat bis zu einem pH-Wert von 7,0 deutliche Aktivität.

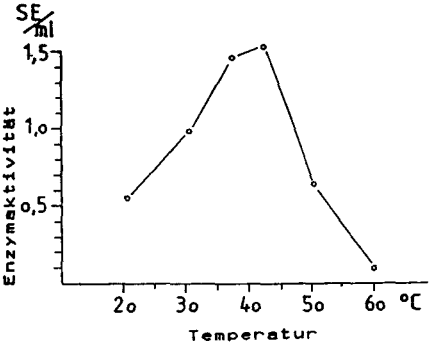


Abbildung 24: Temperaturoptimum der Endo-PG auf Pektinsäure

Aus dem ARRHENIUS-Plot folgt eine Aktivierungsenergie von 47 KJ/Mol. Die optimale Temperatur erschien mit 42° C niedrig; deshalb wurde der Verlauf der Temperaturinaktivierung bei 45° C verfolgt. Es ergab sich ein rascher Abfall der Aktivität mit einer Halbwertszeit von 5,5 Minuten. Das Enzym wurde vollständig inaktiviert.
Diese geringe Temperaturstabilität der Pektinase konnte später ausgenutzt werden, um ein Kulturfiltrat mit inaktivierter Pektinase herzustellen, in dem die anderen Enzyme aller Wahrscheinlichkeit nach noch aktiv waren.

Unter den o.a. optimalen Bedingungen wurde der Km-Wert des Enzyms auf Pektinsäure ermittelt. Aus der Auftragung nach EADEE und HOFSTEE, siehe Abbildung 25, ergibt sich ein K_m-Wert von 0,54 mg/ml Pektinsäure sowie ein V_{max}-Wert von 320 SE/mg Protein.

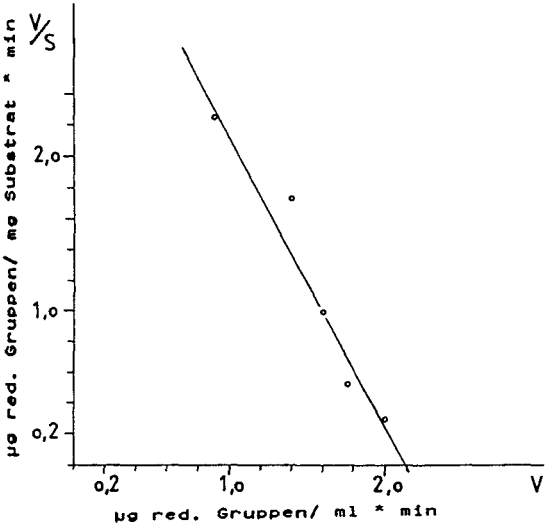


Abbildung 25: Bestimmung von K_m-Wert und V_{max} der Endo-PG auf Pektinsäure im EADEE-HOFSTEE Plot

Spaltmodus des Enzyms

Um zu klären, nach welchem Modus das Substrat gespalten wird, wurden Zeitverlaufskurven der Enzymwirkung aufgenommen. Die Auswertung geschah durch Bestimmung der Zunahme an reduzierenden Gruppen, der Abnahme der Viskosität (Abbildung 26) und durch DC der Reaktionsprodukte (Abbildung 27).

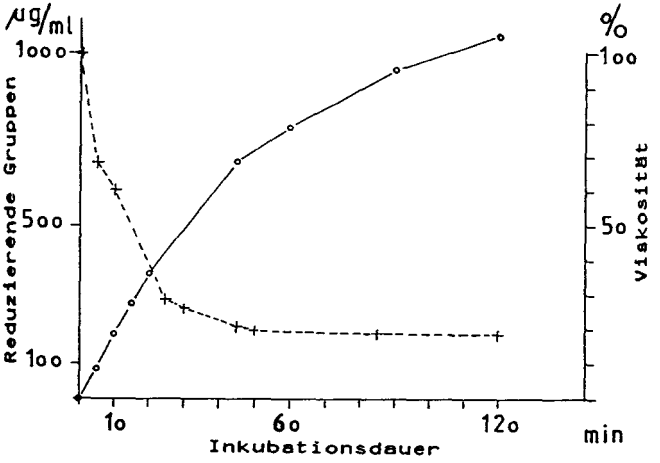
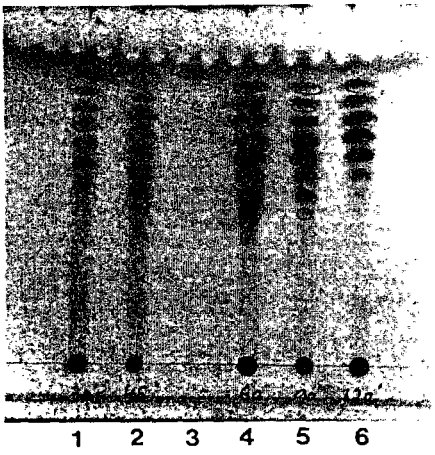


Abbildung 26: Wirkung von Endo-PG auf Pektinsäure
Viskositätsänderung (+) und Zunahme red. Gruppen (0)

Man erkennt einen raschen Abfall der Viskosität im Verhältniss zu einer langsamen Zunahme der reduzierenden Gruppen. Ein solches Verhalten ist typisch für ein Endoenzym. Nachdem mit 750 µg/ml weniger als 10 % der maximal zu erwartenden reduzierenden Gruppen freigesetzt worden sind, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Auch dies wird für Endoenzyme beschrieben, da deren Affinität zum Substrat mit dem fallenden Polymerisationsgrad oft abnimmt, so z.B. bei der Endopolygalakturonase von Kluyveromyces marxianus (CALL, 1980).
Die dünnschichtchromatographische Trennung der Reaktionspro-

dukte stützte zusätzlich diese Befunde. Man erkennt in Abbildung 27, daß im Verlauf der Reaktion zuerst größere Oligomere entstehen, die dann weiter abgebaut werden. Das Monomer entsteht erst sehr spät.



Spuren 1, 2, 4, 5, 6 Pektinsäure mit Endo-PG nach 30, 45, 60, 90 und 120 Min
Spur 3: Monogalakturonsäure

Abbildung 27: Oligomeren-DC: Endo-PG auf Pektinsäure

Substratspezifität des Enzyms

Bei der Mazeration pflanzlicher Gewebe muß die Pektinase nicht nur unveresterte Pektinsäure sondern verestertes Pektin angreifen können. Es galt deshalb, zu überprüfen, welche Aktivität das Enzym gegen verschiedene Pektine aufweist. Unter optimalen Bedingungen wurden die Aktivität gegen hochverestertes Pektin B und Pektin C untersucht. Gegen diese Pektine besaß das Enzym 70 % der Aktivität gegen Pektinsäure, wenn als Maß die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gemessen wurde.
Die Zeitverlaufskurve zeigte allerdings, daß die Reaktion weitaus früher zum Stillstand kam. Die größten Oligomere,

die aus Pektinsäure bei sehr langer Inkubation entstanden, waren Hexamere, in entsprechenden Ansätzen mit Pektin B waren auch noch Decamere nachweisbar.
Um die Affinität des Enzyms zu Pektin B zu quantifizieren, wurde der Km-Wert bestimmt. Abbildung 28 zeigt den EADEE HOFSTEE Plot, aus dem ein Km-Wert von 8 mg/ml hervorgeht.

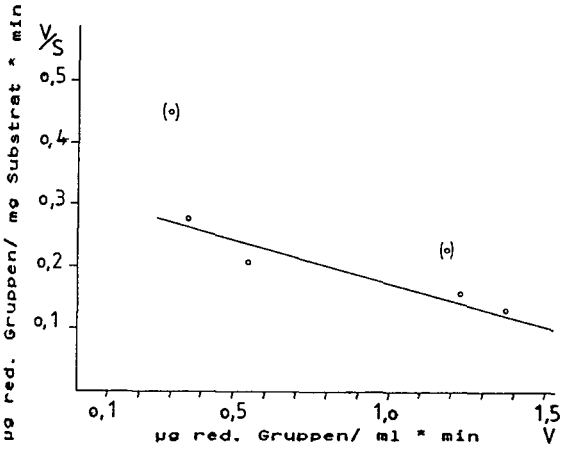


Abbildung 28: EADEE-HOFSTEE Plot der Endo-PG auf Pektin B

Der Km-Wert auf Pektin B liegt also um eine Zehnerpotenz über dem für Pektinsäure. Man kann sich diese Ergebnis so erklären, daß das Enzym nur diejenigen Bindungen spalten kann, an denen unveresterte Galakturonsäure beteiligt ist. Da Pektin B einen Veresterungsgrad von 70 % aufweist, ist die Konzentration an spaltbaren Bindungen drastisch niedriger als bei der unveresterten Pektinsäure. Somit muß eine höhere Pektin B Konzentration eingestellt werden, um das Enzym zu sättigen.

Pektinesterase-Aktivität

Die Pektinesterase-Aktivität wurde sowohl durch Messung des freigesetzten Methanols als auch durch Bestimmung der Carboxylgruppen bestimmt; es konnte auch bei längerer Inkubation keine Methanolfreisetzung festgestellt werden und der pH-Wert des Ansatzes blieb unverändert. Der Kontrollversuch mit käuflicher Pektinesterase bewies, daß die Nachweismethode zuverlässig funktionierte.
Auch die Tatsache, daß verestertes Pektin deutlich weniger weit abgebaut wurde als Pektinsäure, sprach dafür, daß keine Pektinesterase-Aktivität vorhanden war.

Pektinlyase-Aktivität

Die Pektinlyase-Aktivität wurde überprüft, indem die Zunahme der Absorbtion einer Pektin C Lösung bei 235 nm nach enzymatischem Abbau gemessen wurde. Es konnte keine Lyase-aktivität gemessen werden.

Bestimmung des Molekulargewichtes der Pektinase

Aus den Daten der Gelfiltration an AcA 44 und an Sephadex G 75 folgte übereinstimmend ein Molekulargewicht von 36000 Dalton.
Die SDS-PAGE ergab ein Molekulargewicht von 40000 Dalton. Beide Methoden ergaben somit eine recht gute Übereinstimmung, zumal zu bedenken ist, daß das Enzym an der ACA 44 Säule bei der Verwendung niedermolarer Puffer als Elutionsmittel später eluierte. Man mußte also mit einer Wechselwirkung des Enzyms mit der Gelmatrix rechnen, die ein niedrige-

res Molekulargewicht vortäuschte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die gereinigte Pektinase als Endopolygalakturonat-Hydrolase charakterisiert werden konnte.

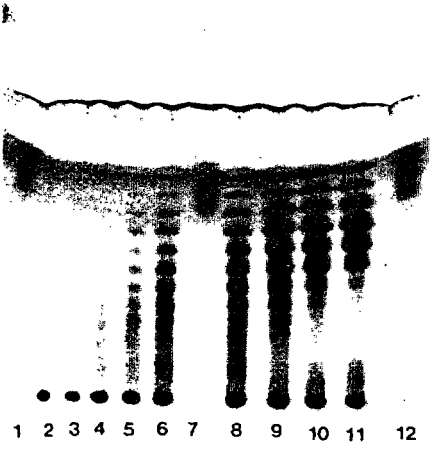
4.4.3.3 Nachweis einer Exopektinase

Bei der Reinigung der Endopolygalakturonase war eine Ausbeute von 58 % der pektinolytischen Ausgangsaktivität erreicht worden. Dieser Wert ist, besonders wenn man die Reinheit des Enzyms bedenkt, sehr hoch. Trotzdem war es möglich, daß bei der Reinigung andere Pektinasen übersehen worden waren. Besonders das Ergebnis der IEF sprach dafür, daß noch weitere Pektinasen vorhanden waren. Die IEF hatte noch weitere, allerdings sehr schwache Banden gezeigt (vergleiche Seite 60, Abbildung 19). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß diese Enzyme maßgeblichen Anteil an der Mazerationsaktivität des Kulturfiltrates hatten. Aus diesem Grund wurde die pektinolytische Aktivität des Kulturfiltrates mit der gereinigten Endopolygalakturonase verglichen. Etwaige Abweichungen hätten dafür gesprochen, weitere Enzyme zu suchen und aufzureinigen.

Im Kulturfiltrat konnten keine Pektinesterase oder Lyase nachgewiesen werden.
Der K_m-Wert des Kulturfiltrates wich nicht von dem des gereinigten Enzyms ab.

Das pH-und das Temperaturoptimum zeigten ebenfalls keine Abweichungen.

Erst bei der Zeitverlaufskurve trat ein Unterschied auf: Das Kulturfiltrat setzte früher als das gereinigte Enzym Monogalakturonsäure frei, siehe Abbildung 29.

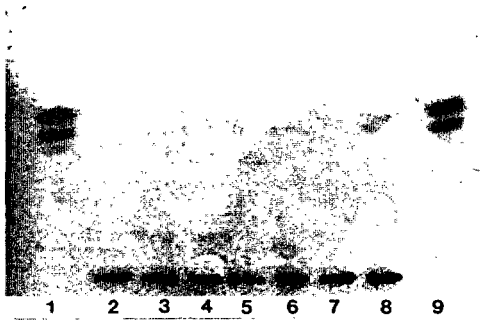


Spuren 1, 7 und 12: Oligomeren-Marker
Spuren 2, 3, 4, 5, 6 8, 9, 10, 11: Pektinsäure mit KF nach: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 90, 120 Min. Inkubation

Abbildung 29: Oligomeren-DC des Zeitverlaufs Abbau von Pektinsäure durch Kulturfiltrat

Es war also möglich, daß tatsächlich noch ein weiteres Enzym vorhanden war. Die Aktivität dieses Enzyms war jedoch so niedrig, daß es schwer war, es in Gegenwart der Endopolygalakturonase sicher zu bestimmen. Dies hätte weitere Reinigungsversuche sehr schwer gemacht.
Auf Grund der niedrigen Temperaturstabilität der Endopolygalakturonase konnte dennoch ein Weg gefunden werden, beide Enzyme zu unterscheiden. Das Kulturfiltrat wurde 45 Minuten bei 45° C inkubiert. Dies entsprach dem 8-fachen der Halbwertszeit der Endopolygalakturonase, hätte also das Enzym auf 0,4 % der Ausgangsaktivität reduzieren müssen. Bei einer Ausgangsaktivität von 6 SE/ml entsprach dies 0,024 SE/ml.
Die gemessene Restaktivität betrug jedoch 0,17 SE/ml.
Eine Dünnschichtchromatographie (Abbildung 30) zeigte, daß

die Restaktivität aus Pektinsäure nur Monogalakturonsäure freisetzte.



Spuren 1 und 9:
Oligomeren-Marker
Spuren 2 bis 8
Exopektinase auf
Pektinsäure nach
0, 1, 2, 4, 8, 16
und 32 Min.

Abbildung 30: Oligomeren-DC der Exopektinase auf Pektinsäure

Eine IEF des inaktivierten Kulturfiltrates zeigte nur noch die drei schwachen Banden in leicht sauren pH-Bereich, die Hauptbande war, wie erwartet, verschwunden (Abbildung 31).

In einer AcA 44 Chromatographie, die entgegen der Theorie mit einem Puffer extrem niedriger Ionenstärke durchgeführt wurde (10 mM Natrium-Phosphat) konnte die Exo-Aktivität von der Endopolygalakturonase abgetrennt werden, da sie früher eluierte. Bei niedrigen Ionenstärken im Elutionspuffer muß mit Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinen und der Gelmatrix gerechnet werden. Dadurch kann es zu einer verzögerten Elution der Proteine kommen.
Das Endoenzym zeigte unter diesen Bedingungen ein stark verzögertes Elutionsverhalten mit einem K_{av} von 0,84, was einem Molekulargewicht von 12000 entsprochen hätte.



Abbildung 31: Aktivitätsfärbung einer IEF der Pektinase im Kulturfiltrat vor und nach Temperaturinaktivierung der Endo-PG

Es konnte somit im Kulturfiltrat ein zweites pektinolytisches Enzym nachgewiesen werden. Diese Enzym besaß Exo-Aktivität, die allerdings nur 3 % der Gesamtaktivität ausmachte. Es war temperaturstabiler als die Endopolygalakturonase.
Auf Grund der geringen Aktivität des Enzyms wurde auf eine Reinigung und weitere Charakterisierung verzichtet.

4.4.4 Untersuchung der Carboxymethylcellulase

Da bei der Analyse der Mazeration die Freisetzung eines Glucose-Dimeren beobachtet wurde, erschien es möglich, daß die CMC-ase an der Mazeration beteiligt war. Aus diesem Grund wurde sie aufgereinigt und charakterisiert.

4.4.4.1 Reinigung der CMC-ase

Nach einer Reihe von Versuchen erwies sich das folgende Verfahren als das beste:
Das Enzym wurde bei einem pH-Wert von 8,5 an DEAE-Cellulose adsorbiert, in einem Salzgradienten eluiert und anschließend einer Gelfiltration an AcA 44 unterzogen. Als Quelle für das Enzym diente ein nach Ultrafiltration und Entsalzung 5-fach konzentriertes GLB-Kulturfiltrat.
Unter den gewählten Bedingungen wurden 90 % der Aktivität an die DEAE-Cellulose adsorbiert. An DEAE-Sephadex banden unter diesen Bedingungen nur 30 % der Aktivität. Die Bindung an den Cellulose-Ionenaustauscher kann somit eher auf eine Affinität zur Matrix als auf eine reine Ionenbindung zurückzuführen sein.
Den Ablauf der Reinigung gibt das folgende Schema wieder:

Tabelle 8: Reinigung der CMC-ase

Reinigungsschritt	Spez. Aktivität	Ausbeute
Kulturfiltrat	4 SE/mg	100 %
Konzentrat	6,6 SE/mg	90 %
Fr. nach DEAE-Cell	7,9 SE/mg	45 %
FR. nach AcA 44	50 SE/mg	25 %

Bei einem Reinigungsfaktor von 12,5 wurde eine Ausbeute von 25 % erreicht.

Nach der Reinigung waren keine Fremdaktivitäten nachweisbar.

4.4.4.2 Charakterisierung der CMC-ase

Tabelle 9 stellt die wesentlichen Charakteristika des Enzyms vor.

Tabelle 9: Eigenschaften der CMC-ase

pH-Optimum	zwischen 3,5 und 5,5
T-Optimum	57,5 °C
Aktivierungsenergie	45 KJ/mol
Spaltmodus	Endoenzym, nach DC, Viskosimetrie und Zeitverlauf
K_m-Wert	2,7 mg/ml
Spezifität	Aktivität gegen, bezogen auf CMC-ase Hydroxyethylcellulose: 35 % Gerstenglucan : 25 % Cellulose, kristallin: 0 %
Molekulargewicht	nach AcA 44: 30 kD nach G 75 : 32 kD
IEP	Banden bei IEP: 4,9; 5,9

Das Enzym ist nach diesen Daten eine Endo-β-1,4-Glucan-Glucano-Hydrolase.

4.4.5 Untersuchung der Galaktomannanase

Als die optimale C-Quelle zur Gewinnung mazerierender Enzyme hatte sich das Galaktomannan Locust-Bean Gum herausgestellt. Es wird aus dem Endosperm der Samen des Johannisbrot-Baums, Ceratonia siliqua, gewonnen. Die handelsüblichen Produkte enthalten 88 % Galaktomannan, 3-4 % Hemicellulose, 1-4% Cellulose, 3-4 % Protein und 1 % Asche. Das Galaktomannan besteht aus einem unverzweigten β-1,4-Mannan, das an jedem vierten Mannose-Rest Galaktose in α-1,6-Bindung trägt. Es wird hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel eingesetzt.

Ein strukturell ähnlich aufgebautes Galaktomannan wird aus der Guar-Pflanze, Cynamopsis tetragonolobus, gewonnen. Im Unterschied zu Locust Bean Gum ist jeder zweite Mannose-Rest mit Galaktose verbunden (GLICKSMAN, 1969).

Eine 1 %ige Lösung dieses Substrates ist hochviskos. Während des Wachstums des Stammes nahm die Viskosität stark ab. Als das dafür verantwortliche Enzym konnte eine Galaktomannanase im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Dieses Enzym trat, im Gegensatz zu den meisten anderen hier behandelten Enzymen, nur beim Wachstum auf Galaktomannan auf. Eine konstitutive Bildung war also nicht nachzuweisen.

Da dieses Enzym offensichtlich dasjenige war, welches dem Organismus das Wachstum auf dem optimalen Substrat erst ermöglichte, wurde es näher untersucht.

4.4.5.1 Reinigung der Galaktomannanase

Bei einer Chromatographie an der AcA 44-Säule fiel auf, daß die Galaktomannanase (GLB-ase) mit einem abnormal hohen K_{av} von 1,0 und gelegentlich sogar noch höher eluierte (Abbildung 32). Wenngleich diese Tatsache eine Molekulargewichtsbestimmung natürlich unmöglich machte, so ermöglichte sie jedoch eine Reinigung.
In einem ersten Schritt wurde das Kulturfiltrat durch Ultrafiltration konzentriert und an Sephadex G 25 entsalzt. Durch diesen Schritt wurden alle Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 4000 Dalton entfernt.
Der zweite Schritt war eine Chromatographie an AcA 44. Durch die Affinität zur Matrix eluierte das Enzym so spät, daß es von allen nachweisbaren Fremdaktivitäten gereinigt wurde.

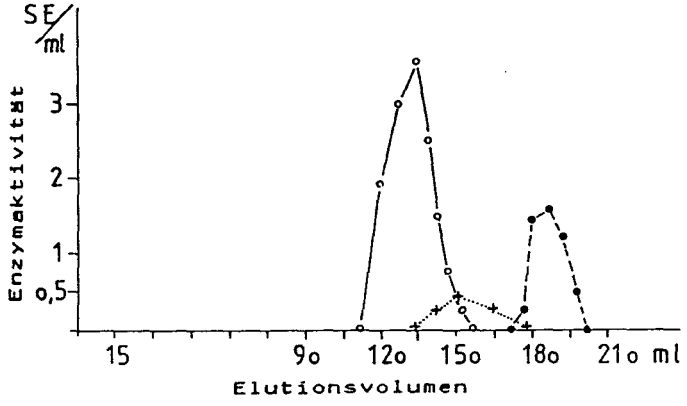


Abbildung 32: Elution der Pektinase (o), CMC-ase (+) und GLB-ase (o) an AcA 44

In einem dritten Schritt wurde es über die Sephadex G 75 Säule gegeben. Auf dieser Säule wurden alle kleineren Proteine (MG bis 15000 D) entfernt.

Die Galaktomannanase konnte dadurch mit 45 % Ausbeute auf 54 SE/mg aufgereinigt werden. Bezogen auf die spezifische Aktivität des Kulturfiltrates ergibt sich ein Reinigungsfaktor von 12. Das Protein zeigte eine Bande in der SDS-PAGE.

4.4.5.2 Charakterisierung der GLB-ase

Tabelle 10 gibt die wesentlichen biochemischen Eigenschaften des Enzyms wieder.

Tabelle 10: Eigenschaften der GLB-ase

pH-Optimum	4,5; 50 % Max. Aktivität zw. 3,0-6,0
T-Optimum	60 °C
Aktivierungsenergie	45 KJ/mol
Spaltmodus	Endoenzym, nach DC und Zeitverlaufskurve
Reaktionsprodukte	Dimere, wahrscheinlich Mannobiose und α-1,6 Gal-Man
Spezifität	für Galactomannan vom GLB-Typ Guar-Typ: nur geringer Abbau
Molekulargewicht	31 kD, nach G 75 Säule 52 kD, nach SDS-PAGE

Der K_m des Enzyms ist größer als 10 mg/ml, wegen der geringen Löslichkeit des Substrates konnte er nicht genau bestimmt werden.

Nach DECKER und RICHARDS (1976) und DECKER (1985) werden Galaktomannane und Glucomannane von β-1,4-Mannanasen abgebaut. Bei der GLB-ase handelt es sich somit um eine Endo-β-1,4-Mannanase (EC: 3.2.1.78).

Da auch beim Einsatz des Kulturfiltrates kein Abbau der entstandenen Dimere beobachtet wurde, müssen die Zucker durch zellwandgebundene oder intrazelluläre Enzyme gespalten und in den Stoffwechsel eingeschleust werden. Die dazu notwendigen Transportmechanismen sind nach Daten von MÖRTBERG und NEUJAHR (1986) vorhanden. Dabei handelt es sich sowohl um energieabhängige als auch um energieunabhängige Systeme. Für einige Disaccharide gibt es zellwandgebundene Glycosidasen, andere werden erst in der Zelle gespalten.
Der hohe Ertragskoeffizient von 0,5 beim Wachstum auf Locust Bean Gum spricht dafür, daß dies recht effektiv geschieht.
Es wurden zusätzlich im Kulturfiltrat Aktivitäten gegen die Methylumbelliferyl-Derivate der α-Galaktose und der β-Mannose nachgewiesen. Diese Aktivitäten wurden in der Gelfiltration von der Galaktomannanase abgetrennt und eluierten in der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose in verschiedenen Fraktionen. Nach diesem Ergebnis hätten beim Abbau des Galaktomannan durch das Kulturfiltrat auch Mannose und Galaktose entstehen müssen. Das dies erst bei sehr langer Inkubation der Fall war, kann dadurch erklärt werden, daß die beiden Glycosidasen zwar synthetische Substrate, nicht jedoch die analogen Zucker-Dimere spalten, wie es auch bei einigen anderen Glycosidasen vorkommt (BACON, 1979).

Sowohl Bakterien als auch Pilze und Pflanzen bilden Mannanasen. Unter den Pilzen sind vor allem Aspergillus-Arten als Enzymproduzenten hervorzuheben.

4.4.6 Mazerationsaktivität der gereinigten Endo-PG, CMC-ase und der Galaktomannanase

Nach der Reinigung der Endo-PG, CMC-ase und GLB-ase wurde untersucht, ob die oben beschriebenen Mazerationseigenschaften des Kulturfiltrates auf die Wirkung der drei Enzyme zurückgeführt werden kann.
Dazu wurden sie einzeln und zusammen in den Konzentrationen in Mazerationstest eingesetzt, in denen sie im Kulturfiltrat vorhanden waren.
Im Mazerationversuch mit Möhren erreichte die Endo-PG nur 10 % der Aktivität des Kulturfiltrates. Diese Aktivität konnte auch nicht durch den Zusatz von CMC-ase und GLB-ase gesteigert werden.
Beim Abbau des Apfelpräparates setzte die Endopolygalakturonase niedere Oligomere frei. Das Dimer und das pektinartige Polymer, die von dem Kulturfiltrat freigesetzt wurden, waren nicht nachweisbar. Auch hier blieb der Zusatz von CMC-ase und GLB-ase ohne Wirkung.

Nach diesen Ergebnissen kann ein Einfluß der CMC-ase und der GLB-ase auf die Mazeration zwar nicht ausgeschlossen werden, es wird jedoch deutlich, daß noch weitere Enzyme an der Mazeration beteiligt sein müssen.

Die Wirkung der Endopolygalakturonase auf Möhren und Apfel beweist, daß sie an der Mazeration beteiligt ist. Für eine vollständige Mazeration müssen weitere Enzyme vorhanden sein.

Die niedrige Temperaturstabilität der Endo-PG bot eine Möglichkeit, diese Hypothese zu überprüfen.

4.4.7 Mazeration mit inaktivierter Endo-PG

In einem Kulturfiltrat mit guter Mazerationsaktivität wurde, wie oben beschrieben, durch 45 minütige Inkubation bei einer Temperatur von 45° C die Endopolygalakturonase vollständig inaktiviert. Die anderen Enzymaktivitäten, d.h. die CMC-ase, GLB-ase und die Esterase wurden dadurch nicht in ihrer Aktivität beinträchtigt.
Tabelle 11 zeigt die Mazerationseigenschaften der Endopolygalakturonase, des Kulturfiltrates nach Temperaturinaktivierung (KF-Inakt.) und der Mischung beider. Die Aktivität des Kulturfiltrates vor der Temperaturinaktivierung entspricht 100 %.

Tabelle 11: Mazerationsaktivität des Kulturfiltrates nach Temperaturinaktivierung der Endo-PG

	Möhre	Apfel
Endo-PG	10%	50%
KF-Inakt.	0%	80%
Endo-PG + KF-Inakt.	100%	100%

Dieses Ergebnis ließ mehrere Schlußfolgerungen zu:

Die Hypothese, das neben der Endo-PG noch weitere Enzyme an der Mazeration beteiligt sind, wird gestützt.
Diese Enzyme müssen eine höhere Temperaturstabilität als die Endo-PG besitzen.

Es gibt Unterschiede zwischen Apfel- und Möhrengeweben, da Äpfel auch ohne Endo-PG aber auch alleine von Endo-PG mazeriert werden, während Möhren nur von dem Gemisch effektiv mazeriert werden.
Zur weiteren Suche der mazerierenden Enzyme erschien aus diesem Grund das Apfelpräparat als das geeignetere Substrat.

4.4.8 Auftrennung der mazerierenden Aktivitäten

Bei der Aufreinigung der Endo-PG hatte sich die Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex als sehr effektiv erwiesen (4.4.3.1). Es war vor allem gelungen, die Endo-PG von allen anderen Enzymen (soweit nachweisbar) zu trennen.
Diese Tatsache sprach dafür, alle Fraktionen der CM-Sephadex Chromatographie auf ihre Aktivität gegen das Apfelpräparat hin zu untersuchen.
Abbildung 33 gibt die Aktivität der einzelnen Fraktionen gegen das Apfelpräparat wieder.
Man erkennt, daß sowohl in den ersten Fraktionen (nicht gebundenes Protein) als auch in den Fraktionen aus dem Salzgradienten Aktivitäten gegen das Präparat vorhanden sind.
Der Verlauf der Proteinkonzentration und das Verhalten der Pektinase ist bereits in Abbildung 20 auf Seite 61 dargestellt. Vor der Pektinase eluierte ein Proteinpeak. In diesem Peak wurde eine Aktivität gegen Methylumbelliferyl-Acetat (Esterase) gemessen. Die Chromatographie ergab also eine Auftrennung des Enzymgemisches in drei Fraktionen:
Das nicht gebundene Protein, im folgenden als Durchlauf bezeichnet, (Elution zwischen 5 und 55 ml)
Die Esterase, (Elution zwischen 65 und 95 ml)
Die Endo-PG, (Elution zwischen 100 und 130 ml).

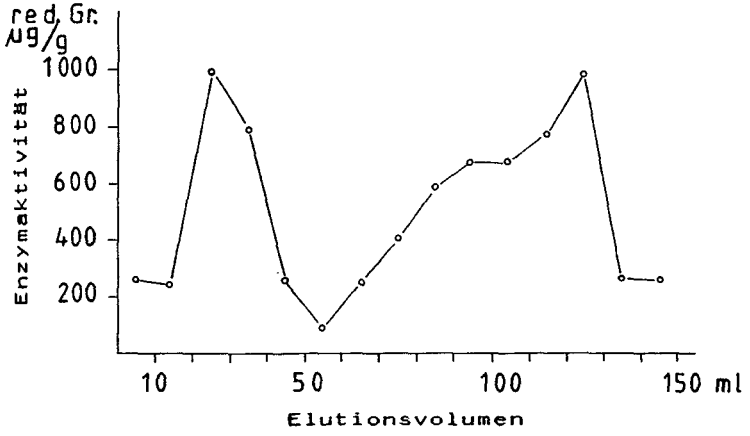


Abbildung 33: Elution der Mazerationsenzyme an CM-Sephadex Mazeration gemessen an der Freisetzung red. Gruppen in µg pro g Apfelpräparat durch die in den Fraktionen enthaltenen Enzyme

Mit diesen drei Fraktionen und Mischungen der Fraktionen wurden nun Mazerationsversuche mit Möhren als Substrat unternommen, da mit diesem Substrat synergistische Effekte weitaus besser nachgewiesen werden konnten (vergl. 4.4.7.).

Man sieht in Tabelle 12, daß bei der CM-Sephadex Chromatographie mindestens drei Enzyme voneinander getrennt worden sind, die sich in ihrer Wirkung gegenseitig unterstützen.

Tabelle 12: Mazerationsaktivität der CM-Sephadex Fraktionen auf Möhren in % der Aktivität des Kulturfiltrats

Durchlauf	0 %
Esterase	0 %
Endo-PG	10 %
Durchlauf + Esterase	25 %
Esterase + Endo-PG	40 %
Durchlauf + Endo-PG	60 %
Durchlauf + Esterase + Endo-PG	100 %

Mit den einzelnen Fraktionen wurde sodann der Abbau des Apfelpräparates genauer untersucht. Dabei wurde bestimmt, wieviel Zucker aus jeweils einem Gramm Präparat, entsprechend 26 mg Trockengewicht freigesetzt wurde. Es wurden die reduzierenden Gruppen, die Uronsäuren sowie die Hexosen bestimmt.
In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zum Abbau des Apfelpräparates mit den drei Fraktionen dargestellt:

Tabelle 13: Abbau des Apfelpräparates mit den Fraktionen der CM-Sephadex Chromatographie

Fraktion	Red. Gruppen µg/g	Hexosen µg/g	Uronsäuren µg/g
Kulturfiltrat	3120	3500	2550
Durchlauf	900	1350	1020
Esterase	600	500	2100
Endo-PG	1740	1000	2300

Es fällt auf, daß die Esterase alleine 80 % der Uronsäuren freisetzt, die auch von dem Kulturfiltrat gelöst werden, dabei aber nur 20 % der reduzierenden Gruppen im Vergleich zum Kulturfiltrat auftreten. Auch ist der Anteil an Hexosen im Esterase-Ansatz um den Faktor 7 niedriger als im Kulturfiltrat.
Dies ließe sich dadurch erklären, daß von der Esterase ein Oligomer oder Polymer aus dem Präparat gelöst wurde, das in der Hauptsache aus Uronsäuren besteht.
Die Pektinase setzt im Vergleich zum Kulturfiltrat über 90 % der Uronsäuren frei, diese dürften aber überwiegend als Monomere und Oligomere vorliegen, da der Gehalt an reduzierenden Gruppen deutlich höher als beim Esterase-Ansatz war.
Endo-PG und Esterase greifen anscheinend dasselbe Substrat an, bauen es aber unterschiedlich ab.

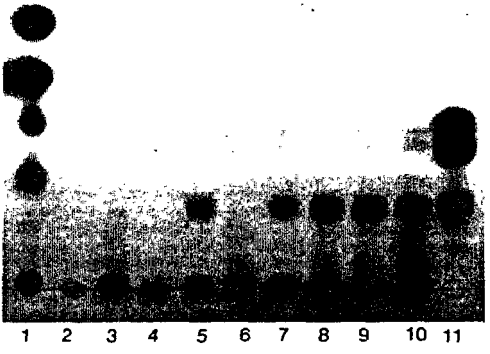
Um das Zusammenwirken der drei Fraktionen zu testen, wurden sie in den folgenden Kombinationen eingesetzt:

Tabelle 14: Abbau von Apfelpräprat mit Kombinationen der Fraktionen der CM-Sephadex angegeben in µg/g Präparat

Kombination	Red. Gruppen
Durchlauf + Esterase	1540
Durchlauf + Endo-PG	3600
Esterase + Endo-PG	1800
Durchlauf + Esterase + Endo-PG	3600

Durchlauf und Pektinase reichen offensichtlich aus, um die Aktivität des Kulturfiltrates zu erreichen. Dieses Ergebnis widerspricht dem Resultat bei der Mazeration der Möhren, wo

die Esterase die Aktivität von Durchlauf und Pektinase weiter steigerte (vergl. Tabelle 12).
Wieder zeigt sich der Unterschied zwischen Apfel und Möhrengewebe als Substrat.
Des weiteren enthält der Durchlauf ein oder mehrere Enzyme, die für die Mazeration wesentlich sind. Der Vergleich der Ansätze mit und ohne Durchlauf in der DC der Monomeren (Abbildung 34) zeigte, daß vor allem das Glucose-Dimer nur gebildet wurde, wenn der Durchlauf im Ansatz vorhanden war.



Spur 1: Marker 1
Spur 2: Nullwert
Spur 3: Endo-PG
Spur 4: Esterase
Spur 5: Durchlauf
Spur 6: Esterase + Endo-PG
Spur 7: Durchlauf + Esterase
Spur 8: Durchlauf + Endo-PG
Spur 9: Durchlauf + Esterase + Endo-PG
Spur 10: KF
Spur 11: Marker 2

Abbildung 34: Monomeren-DC des Abbaus von Apfel mit den Fraktionen der CM-Sephadex Chromatographie

Eine HPLC-Analyse des Ansatzes mit allen drei Fraktionen ergab, daß 1000 µg Dimer gebildet worden war. Als Standard war Cellobiose eingesetzt worden.
In der Folge wurden die Esterase und das Enzym, das das Dimer bildete, weiter gereinigt.

4.4.9 Reinigung der Esterase (Protopektinase)

Der erste Peak der Ionenaustauschchromatographie wurde auf der AcA 44-Säule chromatographiert. Es trat ein enger, symetrischer Peak mit einem K_{av}-Wert von 0,5 auf. Dieser Peak enthielt die Esterase, in den anderen Fraktionen war keine Aktivität nachweisbar. Der enge und symetrische Peak deutete bereits darauf hin, daß das Protein rein war. Eine SDS-PAGE des Proteins bestätigte diese Annahme. Wie Abbildung 21 (Seite 64) zeigt, trat nur eine Bande auf.

4.4.10 Charakterisierung der Esterase (Protopektinase)

Zunächst wurde erneut überprüft, ob es sich bei diesem Enzym nicht doch um eine Pektinesterase handelte. Auch diese Überprüfung verlief negativ.
Da kein definiertes Testsubstrat außer dem Methylumbelliferyl-Acetat für das Enzym gefunden werden konnte, wurde die Aktivität gegen das Apfelpräparat zur Charakterisierung herangezogen.
Das Enzym setzte aus dem Apfelpräparat ein Material frei, das nach den folgenden Kriterien ein Polymer aus Galakturonsäuren und weiteren Zuckern war.

Gewinnung und Analyse des Polymers

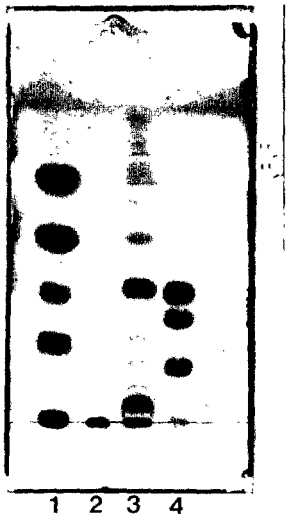
Aus 10 g Apfelpräparat wurde nach Einwirkung der Esterase das Polymer gereinigt (3.6.6.).
Das Enzym löste aus dem Apfelpräparat 340 µg/ml Galakturonsäure und 65 µg/ml reduzierende Gruppen.
Das Enzym setzt also überwiegend Galakturonsäuren frei.

Die 340 µg pro ml Galakturonsäure entsprechen 1,3 mg pro eingesetztem Gramm Apfelpräparat oder, da das Präparat ein Trockengewicht von 26 mg/gr aufwies, 5 % der Trockenmasse.

Das Polymer ließ sich durch Ethanolzusatz oder durch Zusatz von 25 mM Kalziumchlorid fällen.
In Ansätzen mit aktiver Endo-PG trat kein fällbares Polymer auf.
Der Einfluß der Endo-PG konnte leicht dadurch überprüft werden, indem das Apfelpräparat einmal mit Kulturfiltrat und einmal mit Kulturfiltrat nach Hitzeinaktivierung der Endo-PG abgebaut wurde (siehe 4.4.7). Nach der Reaktion konnte aus dem Ansatz mit inaktiver Endo-PG das Polymer isoliert werden, aus dem mit unbehandeltem Kulturfiltrat nicht.

Nach der Reinigung wies das Polymer ein Verhältnis von Galakturonsäuren zu reduzierenden Zuckern von 5,4 auf.

Nach saurer Hydrolyse des Polymers zeigte sich in der DC für Monomere (Abbildung 35), daß es überwiegend aus Galakturonsäure und Arabinose besteht. Des weiteren sind geringe Mengen Rhamnose, Xylose und Galaktose nachweisbar.
Nach diesen Resultaten ist das Polymer ein typisches Pektin (FOGARTY und WARD, 1974; VORAGEN et al. 1986).
Für Pektin aus Äpfeln geben VORAGEN et al. (1986) die folgende Zusammensetzung an:
Rhamnose: 1 % ; Arabinose: 23 % ; Xylose: 2 % ; Galaktose: 4 % ; Glucose: 1 % ; Galakturonsäure: 68 % . Die hier für das Polymer gefundene Zusammensetzung stimmt damit sehr gut überein.



Spur 1: Marker 1
Spur 2: Polymer
Spur 3: Polymer
nach Hydrolyse
Spur 4: Marker 2

Abbildung 35: Monomeren-DC der Hydrolyseprodukte des aus Apfel von der Esterase gelösten Pektins

Das Enzym ist in dem Bereich zwischen pH: 4,5 und 7,5 aktiv.

Ein Enzym, daß aus einem unlöslichen Material ein lösliches Pektin freisetzt, wird als Protopektinase bezeichnet.
Nach FOGARTY und WARD (1974) gibt es mehrere mögliche Gründe für die Unlöslichkeit von Protopektinen.
Dazu zählen:

1.) Ionenbindungen zwischen den Carboxylgruppen der Pektine und den basischen Gruppen von Zellwandproteinen
2.) Sekundäre Valenzen zwischen den Pektinen und anderen Zellwandbestandteilen
3.) Bindungen zu polyvalenten Kationen und daraus resultierende geringere Löslichkeit
4.) Esterbindungen zwischen den Carboxylgruppen der Pektine und Hydroxylgruppen anderer Zellwandbestandteile wie Hemicellulosen und Cellulose

Besonders die letzte Hypothese kann den Wirkungsmechanismus der Protopektinase erklären. Das Enzym hat eine starke Aktivität gegen Methylumbelliferyl-acetat. Es ist somit möglich, daß es sich bei der Protopektinase um eine Esterase handelt, die Bindungen zwischen dem Pektin und anderen Polymeren spaltet und dadurch Pektin freisetzt.

4.4.11 Reinigung des Dimer-freisetzenden Enzymes

Der Durchlauf der CM-Sephadex Ionenaustauschchromatographie wurde an der AcA-44 Säule aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre Aktivität gegen das Apfelpräparat getestet, wobei die Analyse durch DC erfolgte. Es wurde nach den Fraktionen gesucht, bei denen die Freisetzung des Glucose-Dimeren auftrat.
Es wurde ein Peak mit einem K_{av}-Wert von 0,24 gefunden, der die gesuchte Aktivität enthielt.
In der SDS-PAGE wies das Protein eine Bande auf, wie Abbildung 36 zeigt.
Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt nach der Gelfiltration 79 kD, nach der SDS-PAGE 80 kD.

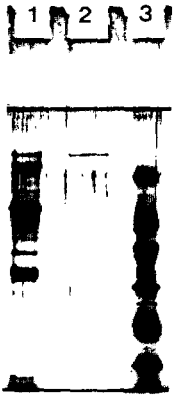


Abbildung 36: SDS-Page des Dimer-freisetzenden Enzyms

Dieses Enzym wies alleine nur noch eine geringe Aktivität auf, wodurch eine weitere enzymatische Charakterisierung erschwert wurde.
In den anderen Fraktionen der AcA 44 Chromatographie konnte keine Aktivität gegen das Apfelpräparat gefunden werden. Dies schließt jedoch nicht aus, daß nicht noch weitere Enzyme vorhanden waren, die erst in einer synergistischen Aktion mit bereits abgetrennten Enzymen aktiv und damit nachweisbar geworden wären.
Die SDS-PAGE des Kulturfiltrates zeigte, wie in Abbildung 36 ersichtlich, daß noch weitere Proteine vorhanden waren. Dies bedeutet natürlich nicht, daß diese Proteine auch an der Mazeration beteiligt sein mußten.
Da bei der Mazeration von Möhren und beim Abbau des Apfelpräparates ein deutlicher Synergismus der Endopolygalakturo-

nase, der Esterase und des Durchlaufs der CM-Sephadex Säule aufgetreten war, (siehe 4.4.8), wurde auch mit den gereinigten Enzymen und ihren Kombinationen überprüft, ob ein solcher synergistischer Effekt beim Abbau des Apfelpräparates auftritt.

4.4.12 Synergistische Aktion der gereinigten Mazerationsenzyme

Die gereinigten Enzyme wurden, soweit möglich, in den Konzentrationen eingesetzt, in denen sie im Kulturfiltrat vorhanden waren. Die Auswertung der Ansätze erfolgte qualitativ durch DC, quantitativ durch HPLC (Tabelle 15).

In den Ansätzen, wo das Dimer-freisetzende Enzym fehlte, konnte kein Dimer nachgewiesen werden.
Das Abbaumuster der Mischung aller Enzyme entsprach sowohl in der DC der Monomeren als auch der der Oligomeren dem des Kulturfiltrates.
Die Aktivität des Kulturfiltrates, bestimmt durch Gehalt an reduzierenden Gruppen im Ansatz, wurde zu 90 % erreicht. Allerdings war die Konzentration an Dimer im Enzymgemisch deutlich niedriger als im Kulturfiltrat.

Die Auswertung der HPLC Analyse beschränkt sich auf drei charakteristische Peaks, die für die Endopolygalakturonase und das Dimer-freisetzende Enzym spezifisch sind. Die Esterase erzeugt mit dem von ihr gelösten Polymer einen Peak, der sich mit einem negativen Lösungsmittelpeak teilweise überlagert und deshalb nicht auswertbar ist.

Für das Dimer-freisetzende Enzym ist ein Peak mit einer Retentionszeit von 9,5 Minuten spezifisch, d.h. er fehlt in den Ansätzen, wo auch das Enzym fehlte.
Für die Endopolygalakturonase sind zwei Peaks spezifisch: der erste mit einer Retentionszeit von 9 Minuten, der zweite bei 11 Minuten. Der zweite Peak ist nach Vergleich mit einem Standard Monogalakturonsäure, der erste aller Wahrscheinlichkeit nach Digalakturonsäure.
Abbildung 37 zeigt ein typisches HPLC-Diagramm der Abbauprodukte des Apfelpräparates mit Kulturfiltrat.

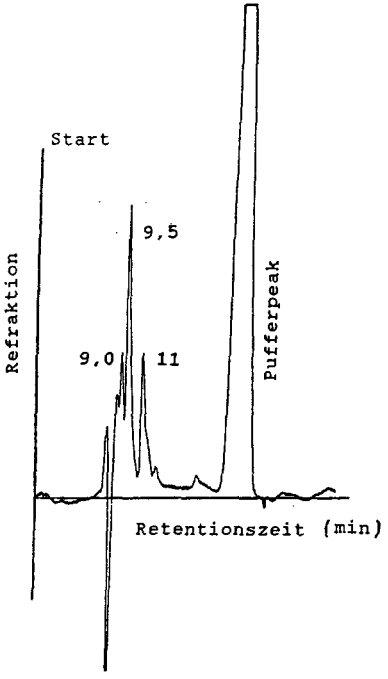


Abbildung 37: HPLC-Analyse des Abbaus des Apfelpräparates

Da sich die Peaks teilweise überlappten, wurde zur Auswertung nicht die Peakfläche sondern die Peakhöhe herangezogen. In Vorversuchen mit definierten Mischungen hatte sich dieses Verfahren als genauer erwiesen (jedenfalls für den verwendeten Integrator). Als interner Standard diente ein Pufferpeak.

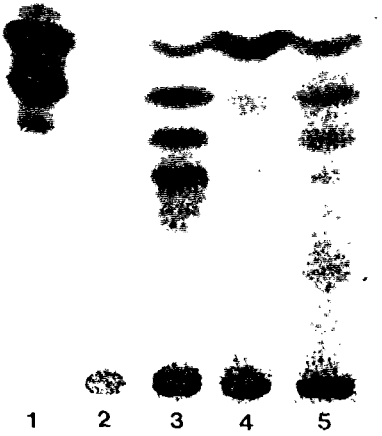
Tabelle 15: Synergismus der Mazerationsenzyme analysiert durch HPLC der Abbauprodukte des Apfelpräparates
Abkürzungen: E= Esterase, D= Dimer-freisetzendes Enzym, P= Endo-PG
Aufgetragen ist für jeden Peak der Prozentsatz bezogen auf den Maximalwert (Ansatz D+E+P)

Enzymkombination	Retentionszeit (min)		
	9,0	9,5	11
D	0	40	0
D+E	0	50	0
D+P	95	100	100
E+P	72	0	100
D+E+P	100	100	100

Das Ergebnis zeigt, daß die Endopolygalakturonase in ihrer Aktivität leicht von dem Dimer-freisetzenden Enzym gesteigert wird, während sie selbst das Dimer-freisetzende Enzym deutlich in seiner Aktivität steigert.

Wurde dem Überstand des Ansatzes D+E+P nachträglich konzentrierte Exopektinase (siehe 4.4.3.3., Enzym, das bei der AcA 44 Chromatographie von der Endo-PG abgetrennt worden war) zugegeben, so verschwand der Peak bei 9 Minuten Retentionszeit, während der bei 9,5 Minuten unverändert erhalten

blieb. Die Konzentration der Exopektinase betrug dabei 0,2 SE/ml, die Inkubation erfolgte über Nacht.
Auch Peaks zwischen 7,5 und 8,5 Minuten wurden abgebaut. Der Peak bei 11 Minuten stieg in diesem Ansatz auf das 6 fache des Ausgangswertes. Dies zeigt, daß ein beträchtlicher Teil der Galakturonsäuren als Oligomere vorlagen. Abbildung 38 zeigt die Oligomeren DC dieses Experimentes. Man erkennt in dem Ansatz mit dem Exoenzym nur noch das Dimer und einen starken Monomerenfleck.



Spur 1: Oligomeren-Marker
Spur 2: Nullwert
Spur 3: Apfelabbau mit Mazerationsenzymen
Spur 4: Material aus 2 mit Exopektinase
Spur 5: Apfelabbau mit Kulturfiltrat

Abbildung 38: Oligomeren-DC von Apfelabbau mit gereinigten Mazerationsenzymen sowie der Exopektinase

Das Kulturfiltrat baut die Galakturonsäureoligomere nicht soweit ab, man muß aber bedenken, daß die Exopektinase in diesem Ansatz circa 10 fach höher konzentriert war als im Kulturfiltrat. Der Test dient also in erster Linie dem Nachweis, daß der Peak bei 9 Minuten ein Dimer aus Galakturonsäure darstellt und daß die Oligomere, die aus dem Apfelpräparat freigesetzt werden, aus Galakturonsäure bestehen.

Die Aktivität der Esterase (Protopektinase), Endo-PG und des Dimer-freisetzenden Enzyms konnte nicht durch Zusatz der CMC-ase oder der GLB-ase gesteigert werden.

Zusammenfassend kann nach diesen Befunden festgestellt werden, daß in dem Kulturfiltrat mindestens drei Enzyme einen Einfluß auf die Mazeration haben. Nur die Endopolygalakturonase konnte durch definierte Substrate charakterisiert werden, für die beiden anderen wurde kein definiertes Substrat gefunden.
Die Natur des Dimer-freisetzenden Enzyms ist unklar. Das Dimer ist nach den Ergebnissen der DC und der HPLC Cellobiose, ein entgültiger Nachweis hierfür steht jedoch noch aus.

Die für das Kulturfiltrat bestimmten Mazerationseigenschaften, also:
1. Freisetzung von Galakturonsäure bzw. ihren Oligomeren
2. Freisetzung eines Pektins
3. Freisetzung eines Glucose-Dimers
konnten durch die Kombination von Endo-PG, Protopektinase und Dimer-freisetzendem Enzym qualitativ reproduziert werden.

Der Ablauf der Mazeration mit Kulturfiltrat stellt sich danach wie folgt dar:
Die Protopektinase löst ein Pektin.
Das Pektin wird von der Endo-PG zumindest partiell hydrolysiert, dabei entstehen Galakturonsäure und ihre Oligomere.
Die Galakturonsäure-oligomere werden von der Exopektinase weiter zu Monogalakturonsäure abgebaut.
Das Dimer-freisetzende Enzym unterstützt die Endo-PG und die Protopektinase, wird aber auch selbst von der Endo-PG unterstützt.

Im Vergleich zu dem Mazerationsverhalten der Pektinase von Candida macedoniensis-Hybriden (MOLITOR, Diplomarbeit, 1990), die nur Galakturonsäure-Oligomere freisetzt, kommt es bei den Enzymen von T. beigelii zu einem weitergehenden Abbau der Zellwand.

Das Glucose-Dimer stammt aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem Cellulose oder Hemicellulose enthaltenden Teil der Primärwand (MASSIOT et al. 1988 a, b).

Die Trennung der Mazerationsenzyme erbrachte also den gewünschten Erfolg.

4.5 Elektrophoretische Karyotypisierung

4.5.1 Grundlagen der Methode

Die erste erfolgreiche Trennung von Hefechromosomen wurde von SCHWARTZ und CANTOR publiziert (1984). Sie konnten bereits einige Banden ihrer Elektropherogramme den entsprechenden Chromosomen zuordnen. Kurze Zeit später gelang es CARLE und OLSON (1984, 1985), alle Chromosomen von Saccharomyces cerevisiae als distinkte Banden darzustellen und zuzuordnen. Sie bezeichneten ihr Vorgehen als elektrophoretische Karyotypisierung.
Bald darauf wurde die Technik von DE JONGE et al. (1986) auf eine Vielzahl von Hefestämmen aus verschiedenen Gattungen angewendet. Es zeigten sich bei den einzelnen Gattungen deutlich unterschiedliche Bandenmuster.
Der Trennbereich der Elektrophorese, der bis dahin bei Molekülen von maximal 2 Megabasen lag, konnte durch SMITH et al. (1987) auf bis zu 7 Megabasen ausgedehnt werden. Ihnen gelang die Trennung des Genoms von Schizosaccharomyces pombe in drei Banden von 3, 5 und 6 Megabasen. Zusätzlich beobachteten sie eine weitere Bande von 0,5 Megabasen, die sie keinem bisher bekannten genetischen Element dieser Hefe zuordnen konnten. Aus genetischen Untersuchungen war bereits bekannt, daß S. pombe nur über drei Chromosomen verfügt.
JOHNSTON et al.(1988) beschrieben weitere elektrophoretische Karyotypen diverser Hefen, allerdings wiederum keine für Trichosporon. Nach den Arbeiten von TANAKA et al.(1987) und MAGEE und MAGEE (1987) ist die Gattung Candida neben Saccharomyces die am besten durch elektrophoretische Karyotypisierung untersuchte Gattung.
Die hohe Stammspezifität der Bandenmuster zeigen Arbeiten von HOFFMANN et al. (1987) und ZIMMERMANN et al. (1988).

HOFFMANN zeigte, daß bereits innerhalb der Art Saccharomyces cerevisiae einzelne Stämme sich in ihrem Bandenmuster deutlich unterscheiden, während ZIMMERMANN dies für Kluyveromyces marxianus und seine imperfekte Form Candida macedoniensis nachweisen konnte. In beiden Arbeiten konnten auch Hybride zwischen den untersuchten Stämmen in Bezug auf die Zusammensetzung ihres Genoms analysiert werden.
RUSTCHENKO-BULGAC et al. (1990) demonstrierten, daß sich Mutanten eines Candida albicans Stammes in ihrem elektrophoretischen Karyotyp unterscheiden.
Neben der elektrophoretischen Karyotypisierung erlauben die Trennungen der Chromosomen die Zuordnung klonierter Gene zu einzelnen Chromosomen. Dazu werden die klonierten Gene als Proben für Hybridisierungen an SOUTHERN-Blots der Chromosomentrennungen eingesetzt. PRETORIUS und MARMUR (1988) konnten so die Gene für die Amyloglucosidase von S. diastaticus lokalisieren.

Es war bisher nicht gelungen, die Chromosomen von Trichosporon beigelii aufzutrennen.

Zur erfolgreichen Analyse des Karyotyps sind zwei Voraussetzungen zu erfüllen:
Erstens muß die DNA aus den Zellen in intakter Form präpariert werden. Dazu werden die Zellen zunächst enzymatisch protoplastiert und die Protoplasten in eine Agarosematrix eingehüllt. Dadurch ist die DNA vor mechanischem Stress geschützt. Der Schutz vor DNAsen wird durch hohe EDTA-Konzentrationen in den Puffern erreicht.
Zweitens muß ein spezielles Verfahren der Agarosegelelektrophorese die Trennung der extrem großen DNA Moleküle ermöglichen. Hierzu stehen seit den letzten Jahren diverse Techniken der Elektrophorese in gepulsten Feldern zur Verfü-

gung (ZIMMERMANN et al. 1989). Allen Verfahren ist gemeinsam, daß die DNA abwechselnd elektrischen Feldern unterschiedlicher Orientierung ausgesetzt wird. Bei jedem Wechsel des Feldes muß sich die DNA zunächst in Richtung des neuen Feldes umorientieren. Die zur Umorientierung benötigte Zeit ist von der Molekülgröße abhängig und ist der Parameter, der die Trennung bewirkt. SCHWARTZ und KOVAL (1989) zeigten an Hand von Mikrofotographien, wie sich die DNA in einem Gel nach dem Wechsel der Feldrichtung umlagert.

Nach Angaben kommerzieller Hersteller von Elektrophoreseanlagen liegt der maximale Trennbereich zur Zeit bei 10-15 Megabasen. 15 Megabasen entspricht dem kompletten Genom eines Saccharomyces cerevisiae Haplonten (MORTIMER und SCHILD, 1985).

4.5.2 Protoplastierung von T. beigelii

Bei der Herstellung des Probenmaterials mußte vor allem die Protoplastierung der Zellen optimiert werden. Das oft zur Protoplastierung vieler Hefen eingesetzte Enzymgemisch Zymolyase erwies sich als ineffektiv. Nach Arbeiten von BASTIDE et al. (1975) gehört Trichosporon beigelii in Hinblick auf seinen Zellwandaufbau zu den basidiomycetalen Hefen, während Zymolyase eher für ascomycetale Organismen einsetzbar ist. Nach einer Vielzahl von Versuchen gelang es, durch den kombinierten Einsatz von Novozym G 234, Novoflex und einer α-Amylase Zellen aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase zu protoplastieren. Dabei kam es nicht zu einem vollständigen Zellwandabbau. Vielmehr wurde nur die Wand an der Spitze der länglichen Zellen abgebaut, wodurch die Protoplasten bei einer Verringerung des osmotischen Drucks im Ansatz

aus den Zellen herausschlüpften. Der zur Kontrolle ebenfalls untersuchte Stamm 70698 war weitaus einfacher zu protoplastieren.
Durch fraktionierte Zentrifugation konnte eine von Zellwandresten fast freie Protoplastensuspension erhalten werden. Diese Protoplasten wurden in Agarose eingehüllt und nach Standardverfahren weiter behandelt.(ZIMMERMANN et al., 1988).

4.5.3 Parameter der Chromosomenelektrophorese

Eine erfolgreiche Trennung der Chromosomen erforderte Bedingungen bei der Elektrophorese, wie sie für die Trennung der Chromosomen von Schizosaccharomyces pombe beschrieben werden, d.h. niedrige Spannungen, lange Pulsdauern und sehr lange Laufdauer.
Abbildung 39 zeigt die Trennung der Chromosomen der Stämme 5790 und 70698 im Vergleich mit S. pombe und S. cerevisiae. Man erkennt in der Abbildung, daß die Chromosomen der Trichosporon-Stämme in dem Größenbereich der S. pombe Chromosomen liegen. Beide Trichosporon-Stämme unterscheiden sich in ihrem Bandenmuster. Stamm 5790 zeigt noch eine Bande auf Höhe der Killer-RNA von S. cerevisiae. Die Natur dieser Bande ist unbekannt.
Man kann mit Sicherheit sagen, daß die Chromosomen von T. beigelii im Vergleich zu denen vieler anderer Hefen sehr groß sind. In den o.a. Arbeiten wurden Chromosomen im Bereich bis zu 3 Megabasen nachgewiesen. Dies trifft nach Ergebnissen von DOBBERSTEIN (1990) auch auf die Chromosomen der basidiomycetalen Hefe Aureobasidium pullulans zu. Der hier zur Trennung notwendige Bereich erstreckt sich demgegenüber bis 6 Megabasen.

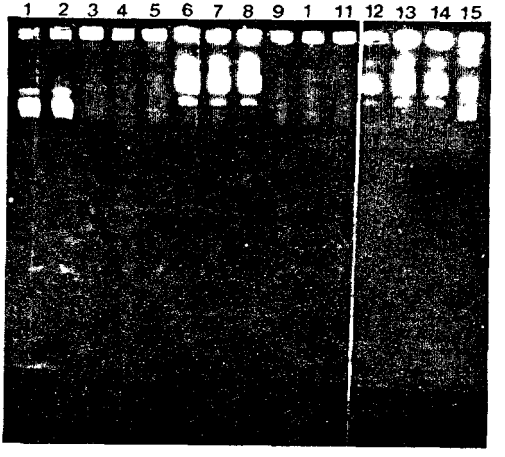
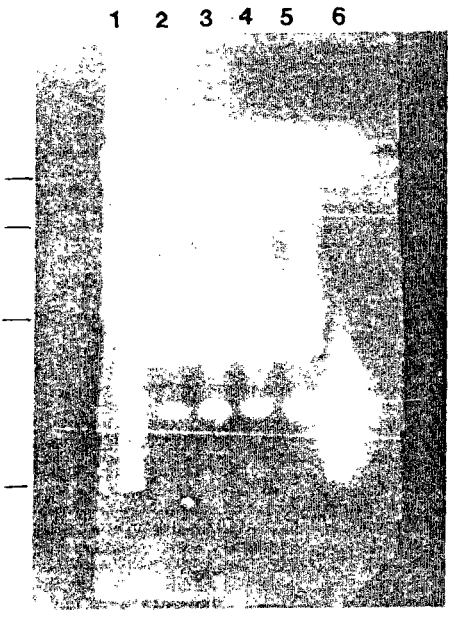


Abbildung 39: Chromosomentrennung von T. Beigelii
Spannung: 30 V; Pulsdauer: 60 Min.
Gel: 1 % in 0,4 TBE-Puffer
Laufdauer: 72 h
Bahnen 1, 2: S. cerevisiae;
Bahnen 3, 4, 5, 9, 10, 11: 5790
Bahnen 6, 7, 8, 12, 13, 14: 70698
Bahn 15: Schizosaccharomyces pombe

Weitere Optimierungen der Trennparameter ergaben eine verbesserte Trennung der Chromosomen des Stammes 70698 (Abbildung 40).



Bahn 1: S. pombe
Bahnen 2, 3, 4, 5
Stamm 70698
Bahn 6: S. cerevisiae

Die Balken bezeichnen die Lage der 0,5; 3; 5 und 6 MB- Marker

Abbildung 40: Chromosomentrennung von T. cutaneum 70698
Spannung: 24 h 40 V, 24 h 50 V, 96 h 60 V
Pulsdauer: 60 Min. , die anderen Parameter siehe Abbildung 36

Diese Ergebnisse zeigen, daß zwei T. beigelii (cutaneum) Stämme sich in ihrer Protoplastierbarkeit und in ihrem elektrophoretischen Karyotyp deutlich unterscheiden. Wenngleich dies kein Beweis dafür ist, daß der CBS Stamm 5790 unbedenklich ist, wird doch klar, daß innerhalb der Art große Unterschiede zwischen den Stämmen bestehen. Wenn aber solche Unterschiede bestehen, so erscheint es nicht gerechtfertigt, Stamm 5790 von vorneherein wegen einer möglichen Pathogenität als Produktionsstamm abzulehnen.

5. Abschlußdiskussion und Ausblick

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob T. beigelii extrazelluläre, polysaccharidspaltende Enzyme bildet, die die Hefe in die Lage versetzen, pflanzliches Material abzubauen.
Diese Frage kann, was die Menge und die Charakteristika der gebildeten Enzyme betrifft, eindeutig bejaht werden.

Die Glucoamylase ermöglicht der Hefe ein sehr gutes Wachstum auf stärkehaltigen Rohstoffen. Das Enzym ist zudem in einem weitem pH und Temperaturbereich einsetzbar.
Die Xylanase, Galaktomannanase, Pektinase und Carboxymethylcellulase erlauben darüber hinaus das Wachstum auf praktisch allen pflanzlichen Rohstoffen, außer Lignin und kristalliner Cellulose.

Die Produktion extrazellulärer Amylasen ist für eine Reihe von Hefen aus verschiedenen systematischen Gruppen beschrieben worden. Eine umfassende Übersicht findet sich bei DE MOT et al.(1984 a, b).
Die hohe Amylase-Aktivität, die T. beigelii bildet, weicht jedoch von der anderer Hefen ab. So bildet Schwanniomyces castellii nur 0,6 bis 0,8 SE/ml(HINTZ, 1987).
Auffällig ist ebenfalls die hohe Produktion auf Glucose. Die meisten der von DE MOT et al.(1984c) untersuchten Hefen benötigen Stärke oder ähnliche Substrate zur Enzymbildung.
Ein Amylasesystem, das den vollständigen Abbau von Stärke ermöglicht, tritt nur bei wenigen Arten auf, so z.B. bei Trichosporon pullulans (DE MOT et al. 1984 b) oder Schwanniomyces occidentalis (HINTZ, 1987). Auch Saccharomycopsis fibuligera, der Stärke vollständig verzuckert, bildet nach

Ergebnissen von BARTSCH (Diplomarbeit, 1990) neben einer Glucoamylase mit ausschließlicher α 1-4 Aktivität noch eine Glucoamylase mit α-1,4 und 1,6 Aktivität.
Eine unvollständige Stärkeverzuckerung, wie sie hier auch für Trichosporon beigelii beobachtet wurde, erscheint bei Hefeamylasen eher die Regel zu sein.
In der Gattung Trichosporon wurden Amylasen bisher nur für Trichosporon pullulans von DE MOT et al. (1984 b,c), DE MOT und VERACHTERT (1986) und Trichosporon adeninovorans von BÜTTNER et al. (1988) eingehend untersucht. Dabei zeigte sich für T. pullulans ein System aus α-Amylase und mehreren Glucoamylasen, während T. adeninovorans nur über eine Glucoamylase verfügt.
Die Glucoamylase von T. beigelii unterscheidet sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht wesentlich von entsprechenden Enzymen anderer Hefen. Sie ist nicht in der Lage, α-1,6 Bindungen zu spalten. Dies trifft auch für die Glucoamylase von Saccharomyces diastaticus zu, wie HANSEN (1988) zeigen konnte.
Die kinetischen Daten der hier beschriebenen Glucoamylase liegen im Rahmen der Werte für andere Hefen. Der K_m-Wert von 0,6 mg/ml Stärke entspricht in etwa denen für T. adeninovorans (1,2 mg/ml, BÜTTNER et al. ,1988) und Schwanniomyces occidentalis (2,3 mg/ml, HINTZ, 1987). Die geringe Aktivität gegen Maltotriose bzw. Maltose weicht vom Verhalten der o.a. anderen Glucoamylasen ab. Mit 33 SE/mg hat das Enzym eine geringere spezifische Aktivität als das Enzym aus Schwanniomyces (78 SE/mg, HINTZ, 1987).
Bezüglich des Molekulargewichtes und des Glycoproteincharakters ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zu anderen Glucoamylasen.
Der Aufbau des Enzyms aus einer Proteinkette unterscheidet es vom Aufbau der von dem STA 1 Gen codierten Glucoamylase

aus Saccharomyces diastaticus. Dieses Enzym besteht aus mehreren Untereinheiten mit unterschiedlichem Molekulargewicht, die des weiteren unterschiedlich proteolytisch prozessiert werden können (YAMASHITA et al. 1984, 1985, 1986). Die Glucoamylase von Schwanniomyces besteht demgegenüber ebenfalls nur aus einer Untereinheit (HINTZ, 1987).

Die Temperaturstabilität der gereinigten, thermolabileren Hauptaktivität ist signifikant niedriger als die anderer Glucoamylasen, so z.B. der von Schwanniomyces. Die Stabilität der thermoresistenteren Form erreicht jedoch die der Glucoamylase aus dem thermophilen Organismus T. adeninovorans (BÖTTNER et al. 1988). Das Kulturfiltrat erreicht somit eine hohe Temperaturstabilität.

Die fehlende Endprodukthemmung des Enzymes unterscheidet es von den o.a. anderen Hefeenzymen.

Für eine Reihe von extrazellulären Enzymen aus Hefen sind mehrere Isoenzyme beschrieben worden. Diese wurden zumeist nur durch ihr Verhalten in der IEF charakterisiert. Dies gilt z.B für Pektinasen aus Kluyveromyces marxianus oder Candida macedoniensis (CALL, 1984; KOLVENBACH, 1987) ; Xylanase aus Aureobasidium pullulans (DOBBERSTEIN, 1990) oder Amylasen aus Schwanniomyces occidentalis. Auch die Glucoamylase von Trichosporon pullulans tritt in mehreren Formen auf(DE MOT und VERACHTERT, 1986).

Die Bildung verschiedener Isoenzyme kann einerseits darauf zurückzuführen sein, daß mehrere Gene für die entsprechenden Enzyme kodieren. Dies ist zum Beispiel bei der Glucoamylase aus Saccharomyces diastaticus der Fall, wo es drei Gene, STA 1, 2 und 3 genannt gibt. Diese Gene kodieren für leicht unterschiedliche Enzyme (TAMAKI, 1980).

Auch die Maltase von S. cerevisiae wird von mehreren Genen codiert. Die einzelnen Isoenzyme unterscheiden sich in ihrer Temperaturstabilität (EATON und ZIMMERMANN, 1976).

Andererseits kann auch ein Genprodukt durch unterschiedliche Proteolyse und Glycosylierung zu verschiedenen Enzymen umgewandelt werden. Diese Möglichkeit ist ebenfalls für die Glucoamylase von Saccharomyces diastaticus beschrieben worden (YAMASHITA et al. , 1985). Unter der Annahme, daß in einem Stamm gleichzeitig beide Mechanismen wirksam sind, kann man die hohe Zahl an Isoenzymbanden, die für einige Enzyme beschrieben werden, verstehen.
Für die Glucoamylase von T. beigelii konnte gezeigt werden, daß Isoenzyme mit , soweit meßbar, gleichen biochemischen Charakteristika sich in ihrer Temperaturstabilität deutlich unterschieden. Ein ähnliches Phänomen beobachteten MAHONEY und WILDER (1988) an der Lactase von Kluyveromyces marxianus. Auch dieses Enzym kam in Form mehrerer Isoenzyme mit unterschiedlicher Temperaturstabilität vor. Hier ergeben sich sich interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. So könnte versucht werden, beide Enzyme in ihrer Primärstruktur aufzuklären. Dazu müßten beide gereinigt und sequenziert werden.
Der Vergleich beider Primärstrukturen könnte Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen Struktur und Temperaturstabilität von Enzymen ermöglichen. Dieses System erscheint besonders geeignet, da es sich um sehr ähnliche Enzyme handelt.

Über die Bildung cellulytischer Enzyme durch T. beigelii lagen, wie in der Einleitung erwähnt, widersprüchliche Berichte vor. Nach den vorliegenden Resultaten kann gesagt werden, daß T. beigelii ein Enzym ausschleust, das Carboxymethylcellulose und Hydroxyethlcellulose nach einem Endomechanismus spaltet. Ein vollständiges Cellulasesystem, das einen Abbau nativer, kristalliner Cellulose ermöglicht, wird nicht gebildet.

Die Bildung des Enzyms ist anscheinend konstitutiv, da auf verschiedenen Substraten, einschließlich Glucose, vergleichbar hohe Mengen ausgeschleust werden.
Die Reinigung der Carboxymethylcellulase kann in Analogie zu Resultaten von BOYER et al. (1986) als eine kombinierte Ionenaustausch/ Affinitätschromatographie bezeichnet werden. Diese Methode wurde von MARSHALL (1973) bei der Reinigung einer β-Glucanase aus Schnecken entwickelt.
PIEL et al. (1990) reinigten und charakterisierten eine Endo-β-1,4-Glucanase aus Aureobasidium pullulans. Dieses Enzym wich in seinen biochemischen Eigenschaften und seinem Molekulargewicht nur unwesentlich von dem Enzym von T. beigelii ab.
Eine Aktivität des Enzyms gegen Xylan, wie sie z.B. bei Trichoderma viride-Cellulasen beobachtet wurde (BELDMAN et al. 1986) tritt nicht auf.

Andere Hefen, die Cellulase bilden, sind bisher nicht beschrieben worden. In einem längeren Screening auf Cellulasebildende Hefen fand LOGGEN (Diplomarbeit, 1987) ebenso wie ZEMEK et al. (1981) nur bei Aureobasidum und Trichosporon Stämme mit hoher Aktivität.

Gute Cellulase-Bildner finden sich bei Bakterien in den Gattungen Clostridium (FUJINO et al. 1989) und den phytopathogenen Arten der Gattungen Erwinia (BOYER et al. 1984) und Pseudomonas (SCHELL, 1987). Bei den Pilzen sind vor allem Trichoderma-Arten (BELDMAN et al. 1987) und Aspergillus niger (BOYER et al. 1986) gut untersucht.

Für die Xylanase konnten keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden, die von den Resultaten von STÜTTGEN und SAHM (1982) abwichen. Insbesondere konnte keine Debranching Aktivität

nachgewiesen werden.

Beim Wachstum auf Locust-Bean Gum wird die Bildung einer Galaktomannanase induziert, deren Charakteristika denen einer Endo-β-1,4-Mannanase entsprechen (DECKER, 1985).
Der Spaltmodus, die Endprodukte, die Affinität zum Substrat und das Molekulargewicht weichen nicht von den Charakteristika anderer Galaktomannanasen aus Pilzen ab (DECKER und RICHARDS, 1976; GODFREY und REICHELT, 1983).
Auffällig ist, daß T. beigelii die Galaktomannanase nur beim Wachstum auf Galaktomannan bildet, während die anderen Enzyme zumindest in geringem Maße auch unter nicht induzierenden Bedingungen gebildet werden.

Das pektinolytische System von T. beigelii besteht aus zwei Enzymen: einer Endopolygalakturonase und einer Exopektinase.

Die Regulation der Enzymbildung ist nicht klar verständlich. Auf Glucose wird Pektinase gebildet. Daß auf Pektin deutlich mehr Pektinase gebildet wird, ließe sich mit einer Induktion der Enzymbildung durch das Substrat bzw. seiner Abbauprodukte erklären. Die hohe Enzymbildung auf Locust-Bean Gum lässt sich eventuell dadurch erklären, daß in dem Locust-Bean Gum andere Kohlenhydrate vorhanden sind, die als Induktur wirken können (GLICKMAN, 1969). Sicher ist jedoch, daß das Enzym nicht rein konstitutiv gebildet wird.

Von der Endopolygalakturonase liegt nur eine Form vor. Darin unterscheidet sich T.beigelii von anderen Hefen, die mehrere Formen dieses Enzyms bilden. So konnte CALL (1980) in einer

isoelektrischen Fokussierung eines Kulturfiltrats von Kluyveromyces marxianus 21 Aktivitätsbanden nachweisen. Er zeigte weiterhin, daß mindestens zwei in ihrem Molekulargewicht unterschiedliche Endopolygalakturonasen vorlagen. SAKAI et al. (1984), trennten bei Kluyveromyces fragilis vier Endopolygalakturonasen nach ihren Molekulargewichten.

Das Molekulargewicht der Endopolygalakturonase unterscheidet sich nicht signifikant von denen anderer Hefepektinasen.
Der IEP des Enzyms liegt jedoch deutlich weiter im Basischen als der vieler anderer vergleichbarer Enzyme, so z.B. von Kluyveromyces marxianus (CALL und EMEIS, 1982) ; Aureobasidium pullulans, Trichosporon penicillatum, Galactomyces reessii, Kluyveromyces fragilis (SAKAI und TAKAOKA, 1985) ; Candida macedoniensis (JACOBS, 1987) ; Candida kefyr und Saccharomyces uvarum (LÖHR, 1982).
Es gibt allerdings Endopolygalakturonasen mit noch höheren IEP-Werten, so z.B. die von Erwinia carotovora mit einem Wert von 10,2 (RIED und COLLMER, 1986).

Da Pektine je nach ihrem Veresterungsgrad mehr oder weniger viele negativ geladene Carboxylgruppen tragen, dürfte der Ladungszustand des Enzyms sich auf die Affinität zum Substrat auswirken. Dies wird deutlich, wenn man die IEP-Werte der Enzyme mit ihren pH-Optima und deren Breite vergleicht.
Die pH-Optima aller hier aufgeführten Enzyme liegen in dem Bereich zwischen den Werten 4,5 und 5,5. Bei einem optimalen pH-Wert liegen die Enzyme somit positiv geladen vor, das Substrat ist negativ geladen.
Bei der Breite der pH-Optima zeigen sich jedoch Unterschiede zwischen T. beigelii auf der einen Seite und A. pullulans, K. fragilis, K. marxianus und C. macedoniensis auf der anderen. Bei einem pH-Wert von 6,5 weist die gereinigte Endopo-

lygalacturonase aus T. beigelii noch 50 % der maximalen Aktivität auf, während die Enzyme der anderen Hefen bei diesem Wert bereits keine oder nur noch sehr geringe Aktivität aufweisen. Da diese Enzyme jedoch auch bei höheren pH-Werten stabil sind, kann es sich bei dem Aktivitätsverlust nicht um eine Inaktivierung der Enzyme handeln.
Eine mögliche Erklärung ist, daß der Ladungszustand des Enzyms seine Affinität zum Substrat beinflusst. Das Enzym von T. beigelii ist auch bei einen pH-Wert von 7,0 noch positiv geladen, während die anderen aufgeführten Enzyme dann bereits ebenso wie ihr Substrat eine negative Gesamtladung aufweisen, was zu einer elektrostatischen Abstoßung führt.

Das Temperaturoptimum und die Temperaturstabilität des Enzyms weichen nicht signifikant von denen anderer Hefepektinasen ab. Besonders der Vergleich von Temperaturoptima aus der Literatur ist zudem problematisch, da oft nicht angegeben wird, wie lange gemessen wurde. Die Temperaturstabilität der meisten untersuchten Pektinasen ist höher als die hier gemessene, es ist aber für Saccharomyces chevalieri eine noch geringere Stabilität gefunden worden (SANCHEZ et al. 1984).
Der K_m des Enzyms liegt mit o,54 mg/ml im Rahmen dessen, was SANCHEZ et al.(1984) für die vier Hefen K. fragilis, C. norvegensis, T. candida und S. chevalieri fanden.
SAKAI und TAKAOKA (1985) geben für die von ihnen untersuchten Hefen um eine Zehnerpotenz höhere Werte an.
Ein Vergleich der V_m-Werte ist wegen zu unterschiedlicher Definitionen der Einheiten nicht möglich. In der Literatur wird sehr oft eine auf die Verringerung der Viskosität einer Pektinsäurelösung bezogene Einheit verwandt, die ohne weitere Angaben über den genauen Spaltmodus des Enzyms nicht in SE umgerechnet werden kann.

Die geringe UV-Absorbtion des Enzyms, die die Reinigung erschwert hatte, ist auch für andere Pektinasen beschrieben. SAKAI und TAKAOKA (1985) geben für die auf die Molmasse des Enzyms bezogene Absorbtion bei 280 nm für ihre Enzyme Werte an, die sich bis zu einem Faktor 15 unterscheiden.

Die Exopektinase-Aktivität von T. beigelii ist ungewöhnlich für Hefen.
In der vorliegenden Literatur sind für Hefen keine Exopektinasen erwähnt. REXOVA-BENKOVA und TIBENSKY (1972) wiesen bei Aspergillus niger Exopolygalakturonase nach und RIED und COLLMER (1986) zeigten, daß auch Erwinia carotovora Exopektinasen besitzt.

T. beigelii bildet nach den vorliegenden Daten keine Lyasen oder Pektinesterasen.
Über die Bildung beider Enzyme durch Hefen liegen nur spärliche Informationen vor. ALIEVA et al.(1980). trennten mit Hilfe einer Affinitätschromatographie an quervernetztem Pektin eine Endopolygalakturonase von einer Pektinesterase aus einem Kulturfiltrat von Geotrichum candidum.

Um eine gute Mazeration von Pflanzengeweben zu ermöglichen, ist eine Pektinesterase nicht unbedingt erforderlich. So enthält das kommerzielle Präparat Rohament P nach ROMBOUTS und PILNICK (1980) keine Pektinesterase.

Die Ergebnisse der Mazerationsversuche zeigen, daß der Wahl des Testsubstrates entscheidende Bedeutung für die Analyse der Mazeration zukommt.
Aus dem Vergleich der Mazerationsversuche mit Äpfeln und Möhren wird deutlich, daß die Zellwände von Äpfeln leichter enzymatisch abbaubar sind.

Das Apfelpräparat konnte mit den gereinigten Enzymen angegriffen werden, während die Mazeration von Möhren nur mit dem Enzymgemisch möglich war. Erst dadurch konnte der starke Synergismus der gereinigten Enzyme überzeugend nachgewiesen werden.
Auch die Wahl der Analysemethode hat einen großen Einfluß auf die Interpretation der Ergebnisse. Es ist ein Unterschied, ob man die Freisetzung von Zellen aus einem Gewebe oder die Freisetzung von Zuckern aus Zellwänden bestimmt. Eine hohe Menge an freigesetzten Zuckern kann auf eine weitgehende Zerstörung der Zellen hindeuten, was man bei der Erhöhung der Saftausbeute wünscht, bei der Mazeration eines Gewebes jedoch vermeiden möchte. Es wäre aus diesem Grund wünschenswert gewesen, wenn die Endopolygalakturonase alleine zur Mazeration fähig gewesen wäre. Diese Erwartung trat jedoch nicht ein. Das Enzym verhält sich in diesem Aspekt wie die Pektinase aus Kluyveromyces marxianus, die ebenfalls schlecht mazeriert.

In fast allen Arbeiten, die sich mit der Analyse mazerierender Enzyme beschäftigten, wurde festgestellt, daß nur pektinolytische Enzyme an der Mazeration beteiligt sind. Dies trifft auf Enzyme von Erwinia chrysanthemi (GARIBALDI und BATEMAN, 1971), Rohament P (EL-REFAI, 1988; LÖHR, 1982), Candida macedoniensis (CALL et al. 1985) und Pseudomonas cepacia (ULRICH, 1975) zu.

Bei T. beigelii ist die Situation offensichtlich anders.

Folgende Punkte gilt es festzuhalten:

Die Endopolygalakturonase von T. beigelii ist an der Mazeration maßgeblich beteiligt, da ohne sie Möhren nicht maze-

riert werden. Das bedeutet, daß sie ihr Substrat in den Zellwänden abbaut. Diese Überlegung wird zusätzlich von der Analyse der Reaktionsprodukte beim Abbau des Apfelpräparates gestützt. Dort werden außer dem Glucose-Dimer in der Hauptsache Galakturonsäure bzw. deren Oligomere freigesetzt. Die fehlende Mazerationsaktivität der gereinigten Endopolygalakturonase kann somit nicht damit erklärt werden, daß das Enzym keine Affinität zum Substrat habe.
ENGLISH et al. (1972) und TALMADGE et al. (1973) untersuchten die Endopolygalakturonase des phytopathogenen Pilzes Colletotrichum lindemuthianum und fanden, daß das Enzym die Zellwände von Acer pseudoplatanus und der Hypocotyle von Phaseolus vulgaris angriff und aus ihnen fast nur Galakturonsäuren freisetzte. Auch MOLITOR (Diplomarbeit, 1990) konnte nachweisen, daß mazerierende Pektinasen des von KOLVENBACH (1987) hergestellten Kluyveromyces-Hybriden nur Galakturonsäuren aus Möhrengeweben herauslösten. Diese Ergebniss belegen, daß es zur Mazeration reicht, wenn nur das Pektin abgebaut wird.

Eine Erklärung für die fehlende Mazerationsaktivität der gereinigten Endopolygalakturonase von T. beigelii ist möglicherweise in der Zugänglichkeit des Substrats für das Enzym zu finden.
Es ist denkbar, daß das Enzym von T. beigelii erst dann sein Substrat abbauen kann, wenn es von anderen Enzymen zugänglich gemacht wurde. Für diese Annahme spricht die Zeitverlaufskurve des Abbaus der Möhrenzellwände. Das Glucose-Dimer erschien weitaus eher als die Galakturonsäuren. Diejenigen Pektinasen, die ohne andere Enzyme mazerieren, müßten danach leichter an ihr Substrat herankommen. Dafür könnten sterische Gründe verantwortlich sein.

Mit Ausnahme einer Arbeit von KARR und ALBERSHEIM (1970) ist in der Literatur noch nicht über einen derartig starken Synergismus mehrerer Enzyme bei der Mazeration berichtet worden, wie er in dieser Arbeit zwischen der Endo-PG, der Protopektinase (Esterase) und dem Dimer-freisetzenden Enzym beobachtet wurde.
Bei der Trennung eines kommerziellen Mazerationsenzyms, Pectinol R 10, isolierten sie ein Protein, daß für die Mazeration notwendig war, obwohl es selbst nur sehr geringe Pektinase-Aktivität aufwies. Da das Enzym alleine aus Zellwänden wasserlösliche, alkoholunlösliche Polymere herauslöste und die Zellwandstruktur veränderte, bezeichneten sie es als "Zellwand-modifizierendes Enzym". Die gelösten Polymere bestanden aus Uronsäuren und neutralen Zuckern. Dieses Enzym verhielt sich damit wie die Protopektinase von T. beigelii. Für dieses Enzym konnten sie, wie auch in dieser Arbeit, kein geeignetes Modellsubstrat finden. Sie zogen daraus den Schluß, daß es nicht zulässig sei, von der Aktivität eines Enzyms gegen ein Modellsubstrat auf seine Aktivität gegen komplexe Substrate zu schließen.
In der Zwischenzeit wurden weitere Beispiele für Enzyme gefunden, die aus Zellwänden Pektine herauslösen.
Trichosporon penicillatum (SAKAI und OKUSHIMA, 1980) sekretiert eine Polygalakturonase, die bei geeigneten Reaktionsbedingungen polymere Pektine aus Citrusfrüchten herauslöst. Auch für Kluyveromyces fragilis und Galactomyces ressii werden von diesen Autoren solche Aktivitäten beschrieben.
Abweichend von diesen Ergebnissen weist das Enzym mit der vergleichbaren Protopektinase-Aktivität aus T. beigelii keine meßbare Polygalakturonase-Aktivität auf.
Diese Befunde stützen im wesentlichen die Ansicht von SAKAI und TAKAOKA (1985): Es gibt nach ihrer Meinung zwei Arten von Endopolygalakturonasen, eine, die nur Pektinsäure abbaut

und eine andere, die zusätzlich noch Protopektinase-Aktivität aufweist.

MC CLENDON (1964) diskutiert einen möglichen Einfluß von Galaktanase oder Arabanase auf die Mazeration. DOBBERSTEIN (1989) konnte eine leichte Steigerung der Mazerationsaktivität eines Candida macedoniensis Kulturfiltrates durch eine Xylanase erreichen.
VORAGEN et al. (1986) berichten von einem Synergismus zwischen Polygalakturonase, Pektinesterase und einer C1-Aktivität beim Abbau eines Apfelpräparates. Die C1-Aktivität verhält sich ähnlich wie das Dimer-freisetzende Enzym aus T. beigelii.
Auch diese Ergebnisse können mit einer verbesserten Zugänglichkeit des Pektins nach Einwirkung anderer Enzyme erklärt werden.

Der Einfluß einer Cellulase auf die Mazeration bzw. die Verflüssigung von Zellen ist von SREENATH et al. (1984, 1986) untersucht worden. Bei Zusatz einer Trichoderma-Cellulase zu Rohament P fanden sie einen Anstieg der Zuckerfreisetzung aus einem gewaschenen Möhrenzellwandpräparat. Wenn durch Chromatographie an Avicell die Cellulase aus Rohament P entfernt wurde, so mazerierte das Enzymgemisch immer noch, es trat jedoch keine Verflüssigung der Zellen auf. Dies bedeutet, daß zur Trennung der Zellen voneinander keine Cellulase notwendig ist.

Aus einer Reihe von Gründen wird T. cutaneum von einigen Autoren als zukunftsträchtiger Organismus für die Biotechnologie angesehen. Zu diesen Gründen zählen sein breites Substratspektrum, sein strikt aerober Stoffwechsel, seine gute

Proteinsekretion und seine Transformierbarkeit (GLUMOFF et al. 1990).
Der wesentliche Nachteil, der einer Anwendung im Wege stehen könnte, ist jedoch seine, wenn auch geringe, Humanpathogenität. Nach UHLIG (1987) ist nicht damit zu rechnen, daß ein Hersteller von Enzymen für die Lebensmittelindustrie einen Organismus einsetzen wird, der nicht "Generally regarded as safe" ist. Selbst wenn dieser Einsatz letztendlich genehmigt würde, so wäre das Genehmigumgsverfahren sehr langwierig und teuer.
Das Ergebniss der elektrophoretischen Karyotypisierung zeigt jedoch, daß zwischen einzelnen T. beigelii Stämmen deutliche Unterschiede bestehen. Es erscheint deshalb gerechtfertigt, genauer zu überprüfen, ob Stamm 5790 nicht doch eingesetzt werden kann.

Einem weiteren Einsatz der Enzyme von T. beigelii für Forschungszwecke steht sicherlich nichts im Wege.
Es ist, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, nicht sonderlich aufwendig, hochgereinigte Glucoamylase, Endopolygalakturonase, Protopektinase, Carboxymethylcellulase und Galaktomannanase zu gewinnen. Diese Enzyme können eingesetzt werden, um Zellwandstrukturen von Pflanzen weiter aufzuklären.

Zunächst sollte dazu die Wirkungsweise der Protopektinase und des Dimer-freisetzenden Enzyms weiter aufgeklärt werden.

6. Zusammenfassung

Folgende Enzyme von Trichosporon beigelii wurden in ihrer Bildung optimiert, gereinigt und charakterisiert:
Glucoamylase, Endopolygalakturonase, Carboxymethycellulase, Galaktomannanase, Protopektinase.
Des weiteren wurde ein Enzym gereinigt, das aus Apfel und Möhrenzellwänden ein Glucose-Dimer freisetzte.
Es konnte ein starker Synergismus zwischen der Endopolygalakturonase, der Protopektinase und dem Dimer-freisetzenden Enzym bei der Mazeration von Apfel- und Möhrengewebe nachgewiesen werden.
Die Mazerationseigenschaften des Kulturfiltrates konnten durch eine Kombination der aus dem Kulturfiltrat gereinigten Enzyme qualitativ reproduziert werden.
Eine Exopektinase wurde gefunden, jedoch nicht näher charakterisiert.
Bei der Untersuchung xylanolytischer Aktivitäten konnten keine Debranching-Enzyme aufgefunden werden.
Eine Trennung der intakten Chromosomen ergab einen elektrophoretischen Karyotyp für den Stamm, der von dem Karyotyp eines anderen T. beigelii Stammes abwich.

7. Literaturverzeichnis

ALBERT, G. (1982): Extrazelluläre Pektinolytische Enzyme einer Hefe der Gattung Cryptococcus, Dissertation, RWTH-Aachen

ALIEVA, E. ; GLADKIHK, T.A. ; KAPITONOVA, L.S. ; RODIONOVA, N.A. ; VASILEVA, K.V. ; AIMUKHAMEDOVA, G.B. (1980): Separation of Pectolytic Enzymes of Microorganisms by Chromatography on Cross-Linked Pectin, Appl. Biochem. Microbiol. 16 (5), 498-502

ASPINALL, G.O. (1985): The Polysaccharides, Academic Press, Inc (London) LTD

BACON, J.S.D. (1979): Factors Limiting the Action of Polysaccharid Degrading Enzymes, in: Microbial Polysaccharids and Polysaccharases, Editors: BERKELY, R.C.W. ; GOODAY, G.W. ; ELLWOOD, D.C. Academic Press, London

BASTIDE, M. ; TRAVE, P. ; BASTIDE, J.-M. (1975): L'Hydrolyse Enzymatique de la Paroi Appliquee a la Classification des Levures, Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 126 A, 275-294

BATEMAN, D.F. ; MILLAR, R.L. (1968):Pectic Enzymes in Tissue Degradation, Ann. Rew. of Phytopath. 4, 119-145

BELDMAN, G. ; VORAGEN, A.G.J. ; ROMBOUTS, F.M. ; PILNICK, W. (1986): Synergism in Cellulose Hydrolysis by Endoglucanases and Exoglucanases Purified from Trichoderma viride, Biotechnol. Bioeng. 31, 173-178, (1988)

BELDMAN, G. ; VORAGEN, A.G.J. ; ROMBOUTS, F.M. ; SEARLE-VAN LEEUVEN, M.F. ; PILNICK, W. (1987): Specific and Non-specific Glucanases from Trichoderma viride, Biotechnol. Bioeng. 31, 160-167, (1988)

BIELY, P. ; KRATKY, Z. ; VRANSKA, M. ; URMANICOVA, D. (1980): Induction and Inducers of Endo-1,4-β-Xylanase in the Yeast Cryptococcus albidus, Eur. J. Biochem. 108, 323-329

BIELY, P. (1985): Microbial Xylanolytic Systems, Trends in Biotechnol. 3 (11), 286-290

BISSWANGER, H. (1979): Theorie und Methoden der Enzymkinetik, Verlag Chemie, Weinheim

BITTER, T. ; MUIR, H.M. (1962): Anal. Biochem. 137, 528 zitiert aus: CHAPLIN, M.F. ; KENNEDY, J.F. (1986): Carbohydrate Analysis- a practical Approach, IRL-Press, Oxford, Washington D.C.

BOYER, M.H. ; CHAMBOST, J.P. ; MAGNAN, M. ; CATTANEO, J. (1984): Carboxymethyl-cellulase from Erwinia chrysanthemi. I. Production and Regulation of Extracellular Carboxymethyl-cellulase, J. of Biotechnol. 1, 229-239

BOYER, R.F. ; ALLEN, T.L. ; DYKEMA, P.A. (1986): Fractionation of Aspergillus niger Cellulases by Combined Ion Exchange Affinity Chromatography, Biotechnol. Bioeng. 24, 176-179, (1987)

BÖTTNER, R. ; BODE, R. ; BIRNBAUM, D. (1988): Purification and Characterization of the extracellular Glucoamylase from the Yeast Trichosporon adeninovorans, J. Bas. Microbiol. Vol. 28 No. 7

CALL, H.P. (1980): Optimierung, Reinigung und Charakterisierung einer Endo-Poly-Galakturonase der Hefe Kluyveromyces marxianus, Dissertation, RWTH Aachen

CALL, H.P. ; EMEIS, C.-C. (1978): Pektinolytische Aktivitäten von Laktose und Milchsäure Assimilierenden Hefen, 1.)Screening auf Pektinolytische und Macerierende Aktivitäten, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 5, 137-142

CALL, H.P. ; WALTER, J. ; EMEIS, C.-C. (1985): Maceration Activity of an Endopolygalacturonase from Candida macedoniensis, J. Food Biochem. 9, 325-348

CARLE, G.F. ; OLSON, M.V. (1984): Separation of Chromosomal DNA Molecules from Yeast by Orthogonal Field Alternation Gel Elektrophoresis, Nucl. Acids Res. 12 (14), 5647-5664

CARLE, G.F. ; OLSON, M.V. (1985): An Elektrophoretic Karyotype for Yeast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3756-3760

DAGYS, R.J. ; PAULIUKONIS, A.B. ; KAZLAUSKAS, D.A. (1984): New Method for the Determination of Kinetic Constants for Two-Stage Deactivation of Biocatalysts, Biotech. Bioeng. 26, 620-622

DE JONGE, P. ; DE JONGE, F.C.M. ; MEIJERS, M. ; STEENSMA, H. Y. ; SCHEFFERS, W.A. (1986): Orthogonal Field Alternation Gel Elektrophoresis Banding Patterns of DNA from Yeasts, Yeast 2, 193-204

DEKKER, R.F. (1985): Biodegradation of the Hemicelluloses, in: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, Editor: HIGUCHI, T. Academic Press; London, New York; 505-533

DEKKER, R.F. ; RICHARDS, G.N. (1976): Hemicellulases: Their Occurence, Funktion, Properties and Mode of Action, Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 32, 277-352

DE MOT, R. ; ANDRIES, K. ; VERACHTERT, H. (1984a): Comparative Study of Starch Degradation and Amylase Production by Ascomycetous Yeast Species, System. Appl. Microbiol. 5, 106-108

DE MOT, R. ; DEMEERSMAN, M. ; VERACHTERT, H. (1984b): Comparative Study of Starch Degradation and Amylase Production by Non-Ascomycetous Yeast Species, System. Appl. Microbiol. 5, 421-432

DE MOT, R. ; VAN OUDENDIJCK, E. ; HOUGAERTS, S. ; VERACHTERT, H. (1984c): Effect of Medium Composition on Amylase Production by some Starch-degrading Yeasts, FEMS Microbiology Letters 25, 169-173

DE MOT, R. ; VERACHTERT, H. (1986): Secretion of alpha-Amylase and Multiple Forms of Glucoamylase by the Yeast Trichosporon pullulans, Can. J. Microbiol. 32, 47-51

DOBBERSTEIN, J. ; EMEIS, C.-C. (1989): β-Xylanase Produced by Aureobasidium pullulans CBS 58475, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 262-268

EATON, R.E. ; ZIMMERMANN, F.K. (1976): Thermal Inactivation of Maltase and Its Application to Temperature-sensitive Mutants of Yeast, Molec. Gen. Genet. 148, 199-204

EL-REFAI, A.A. ; ATTA, M.B. ; HARRAS, A.M. (1987): Studies on Macerating Enzymes, I. Separation and Purification of Endopolygalacturonase from Rohament P Using Preparative Isoelectric Focussing, Chem. Microbiol. Technol. Lebensm. 11, 65-73

EL-REFAI, A.A. ; ATTA, M.B. ; HARRAS, A.M. (1988): Studies on Macerating Enzymes, II. Macerating Activity of Different Enzymes Fractionated from Rohament P, Chem. Microbiol. Technol. Lebensm. 11, 107-114

ENGLISH, P.D. ; MAGLOTHIN, A. ; KEEGSTRA, K. ; ALBERSHEIM, P. (1972): A Cell Wall-degrading Endopolygalakturonase Secreted by Colletotrichum lindemuthanium, Plant Physiol. 49, 293-297

FALL, R. , PHELPS, P. ; SPINDLER, D. (1984): Bioconversion of Xylan to Triglycerides by Oil-Rich Yeasts, Appl. Env. Microbiol. 47, 5, 1130-1134

FIECHTER, A. ; KÄPPELI, O. ; MEUSSDOERFER, F. (1987): Batch and Continuous Culture, in: The Yeasts, Sec. Ed. Vol. 2, Roe, A.H. ; Harrison, J.S. Editors, Academic Press, London

FOGARTY, W.M. ; WARD, O.P. (1974): Pectinases and Pectic Polysaccharides, Process in Industrial Microbiology, HOCKENBULL, D.J.D. Editor

FUJINO, T. ; SUKHUMAVASI, J. ; SASAKI, T. ; OHMIYA, K. ; SHIMIZU, S. (1989): Purification and Properties of an Endo-1,4-β-Glucanase from Clostridium josui, J. of Bact. 171, 4076-4079

HAWKES, H. (1982): Identifikation of Concanavalin A Binding Proteins after Sodium-Dodecyl-Sulfate Gel-Electrophoresis and Protein Blotting, Anal. Biochem. 123, 143-146

GARIBALDI, A. ; BATEMAN, D.F. (1971): Pectic Enzymes Produced by Erwinia chrysanthemi and their Effects on Plant Tissue, Physiol. Plant Path. 1, 24-40

GIANI, C. ; JAEGER, E. ; EMEIS, C.-C. (1980): Dextran-Hydrolyse durch Hefen der Gattungen Cryptococcus und Trichosporon, Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. C1, 92-100

GLICKSMAN, M. (1969): Gum Technology in the Food Industry, Academic Press, New York und London

GLUMOFF, V. ; KÄPPELI, O. ; FIECHTER, A. ; REISER, J. (1989): Genetic Transformation of the Filamentous Yeast, Trichosporon cutaneum, using dominant Selection Markers, Gene, in press

GODFREY, T. ; REICHELT, J. (1983): Industrial Enzymology, The Nature Press, Macmillan Publishers, LTD

HANSEN, M. (1988): Somatische Hybridisierung von Saccharomyces uvarum und Saccharomyces cerevisiae zur Züchtung einer Dextrinvergärenden Brauereihefe, Dissertation, RWTH Aachen

HARTMEIER, W. (1986): Immobilisierte Biokatalysatoren, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

HINTZ, M. (1987): Versuche zur Somatischen Hybridisierung von Schwanniomyces und Saccharomyces mit dem Ziel der Ethanolgewinnung aus Stärke, Dissertation, RWTH Aachen

HEUKESHOVEN, J. ; DERNICK, R. (1983): Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen- in: Radola, B.J. (ed.) : Elektrophorese-Forum 1983, Kurzfassung der Vorträge, 92-97

HOFFMANN, M. ; ZIMMERMANN, M. ; EMEIS, C.-C. (1987): Orthogonal Field Alternation Gel Elektrophoresis (OFAGE) as a Means for the Analysis of Somatic Hybrids Obtained by Protoplast Fusion of Different Saccharomyces Strains, Curr. Genet. 11, 599-603

HOY, J. ; HSU, K.-C. ; ROLSTON, K. ; HOPFER, R.L. ; LUNA, M. BODEY, G.P. (1986): Trichosporon beigelii Infektion, Rev. of Inf. Deseases 8, 6, 959-967

HRMOVA, M. ; BIELY, P. ; VRANSKA, M. ; PETRAKOVA, E. (1984): Induktion of Cellulose- and Xylan-degrading Enzyme Complex in the Yeast Trichosporon cutaneum, Arch Microbiol 138, 371-376

ISHII, S. (1978): Analysis of the Components Released from Potato Tuber Tissues During Maceration by Pectolytic Enzymes, Plant Physiol. 62, 586-589

JACOBS, M. (1987): Protoplastenfusion der Hefen Candida macedoniensis und Saccharomyces cerevisiae zur Optimierung der Vergärung von Obstmaischen, Dissertation, RWTH Aachen

JOHNSTON, J.R. ; CONTOPOULOU, C.R. ; MORTIMER, R.K. (1988): Karyotyping of Yeast Strains of Several Genera by Field Inversion Gel Elektrophoresis, Yeast 4, 191-198

KÄPPELI, O. ; FIECHTER, A. (1982): Growth of Trichosporon cutaneum under Oxygen Limitation: Kinetics of Oxygen Uptake, Biotech. Bioeng. 24, 2519-2526

KOLVENBACH, M. (1987): Hybride zur gleichzeitigen Produktion von Lactase und Mazerationsenzym gewonnen durch Protoplastenfusion von Stämmen der Art Kluyveromyces marxianus, Dissertation, RWTH Aachen

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. (1984): The Yeasts - A Taxonomic Study, Elsevier, Amsterdam

LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of Structural Protein during Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature 227, 680-685

LEATHERS, T.D. (1986): Color Variants of Aureobasidium pullulans Overproduce Xylanase with Extremly High Specific Activity, Appl. Env. Microbiol. 52, 5, 1026-1030

LEE, H. ; TO, R.J.B. ; LATTA, R.K. ; BIELY, P. ; SCHNEIDER H. (1987): Some Properties of Extracellular Acetylxylan Esterase Produced by the Yeast Rhodotorula mucilaginosa, Appl. Env. Microbiol. 53, 12, 2831-2834

LING, A.C. ; LUND, D.B. (1978): Determining Kinetic Parameters for Thermal Inactivation of Heat-Resistant and Heat-Labile Isozymes from Thermal Destruction Curves, J. Food Science 43, 1307-1310

LÖHR, G. (1982): Einfluss Verschiedener Enzyme auf die Mazerationsaktivität von Polygalakturonasen, Untersucht an einem Handelpräparat und an den Polygalakturonasen zweier Hefen, Dissertation, RWTH-Aachen

LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A.L. ; RANDALL, R.J. (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem. 193, 265-275

MAGEE, B.B. ; MAGEE, P.T. (1987): Elektrophoretic Karyotypes and Chromosome Numbers in Candida Species, J. Gen. Microbiol. 133, 425-430

MAHONEY, R.R. ; WILDER, T. (1988): Thermostability of Yeast Lactase (Kluyveromyces marxianus) in Milk, J. of Dairy Res. 55, 423-433

MANDELS, M. ; ANDREOTTI, R. ; ROCHE, C. (1976): Measurement of Saccharifying Cellulase, Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 21-33

MARCINIAK, G.P. ; KULA, M-R. (1982): Vergleichende Untersuchung der Methoden zur Bestimmung der Aktivität bakterieller alpha-Amylasen, Starch/Stärke 34, 422-430

MARSHALL, J.J. (1973): Anal. Biochem. 53, 191

MASSIOT, P. ; ROUAU, X. ; THIBAULT, J.-F. (1988 a): Isolation and Charakterisation of the Cell-Wall Fibres of Carrot, Carbohydrate Res. 172, 217-227

MASSIOT, P. ; ROUAU, X. ; THIBAULT, J.-F. (1988 b): Charakterisation of the Extractable Pectins and Hemicelluloses of the Cell Wall of Carrot, Carbohydrate Res. 172, 229-242

Mc Clendon, J.H. (1964): Evidence for the Pectic Nature of the Middle Lamella of Potato Tuber Cell Walls Based on Chromatography of Macerating Enzymes, Amer. J. Bot. 51 (6) 628-633

MÖRTBERG, M. ; NEUJAHR, H.Y. (1986): Transport and Hydrolysis of Disaccharides in Trichosporon cutaneum, J. of Bact. 168, 2, 734-738

MORRISSEY, J.H. (1981): Silver Stain for Proteins in Polyacrylamid Gels- A Modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity, Anal. Biochem. 117, 307-310

MORTIMER, R. K. ; SCHILD, D. (1985): Genetic Map of Saccharomyces cerevisiae, Microbiol. Rev. 9, 181-212

O'BRIEN, M. ; COLWELL, R.R. (1987): A Rapid Test for Chitinase that Uses 4-Methyumbelliferyl-N-Acetyl-Glucosamine, Appl. Environm. Microbiol. 53, 1718-1720

PHARMACIA: Gelfiltration- Theory and Practice

PHARMACIA: Ion Exchange Chromatography- Principles and Methods

PIEL, C. ; DOBBERSTEIN, J. ; EMEIS, C.-C. (1990): β-Glucanase and β-Glucosidase of Aureobasidium pullulans CBS 58475, Poster VAAM-Tagung, Forum Mikrobiologie 1-2

PORATH, J. ; FLODIN, P. (1959): Gelfiltration- A Method for Desalting and Group Separation, Nature 183, 1657-1659

POU-LLINAS, J. ; DRIGUEZ, H. (1987): D-Xylose as Inducer of the Xylan-degrading Enzyme System in the Yeast Pullularia pullulans, Appl. Microbiol. Biotechnol. 27, 134-138

PRETORIUS, J.S. ; MARMUR, J. (1988): Localisation of Yeast Glucoamylase Genes by PFGE and OFAGE, Curr. Genet. 14, 9-13

RATLEDGE, C. (1988): Yeasts for Lipid Production, Biochemical Society Transactions, IBBG Meeting, 1088-1091

REXOVA-BENKOVA, L. ; MARKOVIC, O. (1976): Pectic Enzymes, in: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 33, Academic Press, New York,

REXOVA-BENKOVA, L. ; TIBENSKY, V. (1972): Selective Purification of Aspergillus niger Endopolygalakturonase by Affinity Chromatography on Cross-linked Pectic Acid, Biochim. Biophys. Acta, 268, 187-193

RIGHETTI, P.G. (1983): Isoelectric Focussing: Theory Methodology and Applications, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam

ROE, J.H. (1955): J. Biol. Chem. 212, 335

ROMBOUTS, F.M. ; PILNICK, W. (1980): Pectic Enzymes, in: Microbial Enzymes and Bioconversions, ROSE,A.J. Ed. Academic Press, New York, 227-282

RUSTCHENKO-BULGAC, E.P. ; SHERMAN, F. ; HICKS, J.B. (1990): Chromosomal Rearrangements Associated with Morphological Mutands Provide a Means for Genetic Variation of Candida albicans, J. Bacteriology 172, (3), 1276-1283

SANCHEZ, J. ; GUIRAUD, J.P. ; GALZY, P. (1984): A Study of the Polygalacturonase Activity of Several Yeast Strains Isolated from Cocoa, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 262-267

SAKAI, T. ; OKUSHIMA, M. , YOSHITAKE, S. (1984): Purification, Crystallisation and some Properties of Endopolygalacturonase from Kluyveromyces fragilis, Agric. Biol. Chem. 48, 8, 1951-1961

SAKAI, T. ; TAKAOKA, A. (1985): Purification, Crystallization and some Properties of Endopolygalacturonase from Aureobasidium pullulans, Agric. Biol. Chem. 49, 2, 449-458

SCHELL, M.A. (1987): Purification and Charakterisation of an Endoglucanase from Pseudomonas solanacearum, Appl. Env. Microbiol. 53, 9, 2237-2241

SCHWARTZ, D.C. ; CANTOR, C.R. (1984): Separation of Yeast Chromosome-sized DNA by Pulsed Field Gradient Gel Elektrophoresis, Cell 37, 67-75

SCHWARTZ, D.C. ; KOVAL, M. (1989): Conformational Dynamics of Individual DNA Molecules During Gel Elektrophoresis, Nature 338, 520-522

SMITH, C.L. ; MATSUMOTO, T. ; NIWA, O. ; KLCO, S. ; FAN, J.; YANAGIDA, M. ; CANTOR, C.R. (1987): An Elektrophoretic Karyotype for Schizosaccharomyces pombe by Pulsed Field Gel Elektrophoresis, Nucl. Acids Res. 15, 4481-4489

SPANNING, A. ; NEUJAHR, H.Y. (1987): Growth and Enzyme Synthesis During Continuous Culture of Trichosporon cutaneum on Phenol, Biotech. Bioeng. 24, 464-468

SPENCER-MARTINS, I. ; VAN-UDEN, N. (1979): Extracellular Amylolytic System of the Yeast Lipomyces kononenkoae, Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 6, 241-250

SPIRO, R.G. (1966): The NELSON-SOMOGYI Copper Reduction Method, in: Methods in Enzymology, Eds.: COLOWICK, S.P. ; KAPLAN, N.O. : Vol. VII

SREENATH, H.K. ; KOGEL, F. ; RADOLA, B.J. (1986): Macerating Properties of a Commercial Pectinase on Carrot and Celery, J. Ferment. Technol. 64, 1, 37-44

STAHL, E. (1967): Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

STEVENS, B.J.H. ; PAYNE, J. (1977): Cellulase and Xylanase Production by Yeasts of the Genus Trichosporon, J. Gen. Microbiol. 100, 381-393

STÖTTGEN, E. (1981): Untersuchungen zum Xylanabbau durch die Hefe *Trichosporon cutaneum* und Charakterisierung der Xylanase, Dissertation, Universität Düsseldorf

STÖTTGEN, E. ; SAHM, H. (1982): Purification and Properties of Endo-1,4-β-Xylanase from Trichosporon cutaneum, Appl. Microbiol. Biotechnol. 15, 93-99

TABLEROS, M.A. ; ENDREβ, H.-U. ; BANNERT, E. ; FINGER, C. SHEN, Z. ; GIERSCHNER, K. (1984): Bestimmung verschiedener Glycosidischer Aktivitäten in Enzympräparaten des Handels, Fruchtsafttagung, Universität Hohenheim

TAHOUN, M.K. ; EL-MERHEB, Z. ; SALAM, A. ; YOUSSEF, A. (1987): Biomass and Lipids from Lactose or Whey by Trichosporon beigelii, Biotech. Bioeng. 24, 358-360

TALMADGE, K.W. ; KEEGSTRA, K. ; BAUER, W.D. ; ALBERSHEIM, P. (1973): The Structure of Plant Cell Walls, Plant Physiol. 51, 158-196

TAMAKI, H. (1980): Purification of Glucoamylase Isozymes Produced by Saccharomyces diastaticus, Doshisha Joshi Daigaku Gakujutzu Kenkyu Nempo, 31, 270-286

TANAKA, H. ; TAKAGI, M. ; YANO, K. (1987): Separation of Chromosomal DNA of Candida maltosa on Agarose Gels Using the OFAGE Technique, Agric. Biol. Chem. 51 (11) 3161-3163

UHLIG, H. (1987): Food Enzymes, Biotec. 1, 109-117

ULRICH, J.M. (1975): Pectic Enzymes of Pseudomonas cepacia and Penetration of Polygalacturonase into Cells, Physiol. Plant Pathol. 5, 37-44

VORAGEN, A.G.J. ; SCHOLS, H.A. ; SILIHA, H.A.I. ; PILNICK, W. (1986): Enzymic Lysis of Pectic Substances in Cell Walls: Some Implications for Fruit Juice Technology, ACS-Symposium Series, 310 ; Chemistry and Function of Pectins, Washington, FISHMEN, M.L. ; JEN, J.J. eds.

WALLING, D.M. ; MC GRAW, D.J. ; MERZ, W.G. ; KARP, J.E. ; HUTCHINS, G.M. (1987): Dissiminated Infection with Trichosporon beigelii, Rev. of Infect. Deseases, 9, 5, 1013-1019

WHITAKER, J.R. (1984): Pectic Substances, Pectic Enzymes and Haze Formation in Fruit Juices, Enzyme Microb. Technol. 6, 341-349

WOOD, T.M. ; MC CRAE, S.J. (1977): Cellulase from Fusarium solani: Purification and Properties of the C1-Component, Carbohydrate Res. 57, 117-133

YAMASHITA, I. ; HATANO, T. ; FUKUI, S. (1984): Subunit Structure of Glucoamylase of Saccharomyces diastaticus, Agric. Biol. Chem. 48 (6), 1611-1616

YAMASHITA, I. ; NAKAMURA, M. ; FUKUI, S. (1985): Diversity of Molekular Strucktures in the Yeast Extracellular Glucoamylases, J. Gen. Appl. Microbiol. 31, 399-401

YAMASHITA, I. ; SUZUKI, K. ; FUKUI, S. (1986): Proteolytic Processing of Glucoamylase in the Yeast Saccharomyces diastaticus, Agric. Biol. Chem. 50 (2), 475-482

ZEMEK, J. ; AUGUSTIN, J. ; KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, A. ; KUNIAK, L. (1981): Production of β-Glucosidase, Exo-β-1,4-Glucanase and Endo-β-1,4-Glucanase at Yeasts and Yeast-like Organisms, Biologia (Bratislava), 36, 6, 439-444

ZIMMERMANN, M. ; HOFFMANN-HINTZ, M. ; KOLVENBACH, M. ; EMEIS, C.-C. (1988): OFAGE Banding Patterns of Different Yeast Genera and of Intergeneric Hybrids, J. Bas. Microbiol. 28, 241-249

ZIMMERMANN, M. ; EMEIS, C.-C. (1989): Extracellular Polysaccharidases from Trichosporon beigelii, Yeast 5, Special Issue, 131-133

ZIMMERMANN, M. ; SCHILLBERG, S. ; EMEIS, C.-C. (1989): Trennung Hochmolekularer DNA durch PFGE-Grundlagen und Anwendungen, Performance 3, Pharmacia-LKB , 13-15

Verzeichnis der Diplomarbeiten

Alle zitierten Diplomarbeiten stammen aus dem Institut für Biologie IV, Mikrobiologie, der RWTH-Aachen.

BARTSCH, E., 1990

Versuche zur Reinigung und Charakterisierung der Glucoamylase von Saccharomycopsis fibuligera

LOGGEN, U

Untersuchungen von β-Glucanasen bei Hefen

MICZKA, G., 1986

Xylanaseproduktion bei Hefen der Art Trichosporon beigelii

MOLITOR, M., 1990

Fermentation von Kluyveromyces marxianus-Candida macedoniensis-Hybriden zur gleichzeitigen Produktion von β-Galaktosidase und Mazerationsenzym

Lebenslauf

Name:	Martin Zimmermann
Eltern:	Franz Zimmermann und Gertrud, geb. Kern
9. 5. 1960	geboren in Aachen
1966-1970	Besuch der Grundschule
1970-1979	Besuch des Couven-Gymnasiums in Aachen
29. 5. 1979	Abitur
1979-1980	Grundwehrdienst
1980-1986	Studium der Biologie an der RWTH-Aachen
3. 11. 1982	Vordiplom
30. 7. 1986	Diplom
1.10. 1986-31. 7. 1988	Stipendiat der DECHEMA
Seit 1. 8. 1988	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Mikrobiologie der RWTH-Aachen

Aachen, im November 1990

Danksagung

Herrn Prof. Dr. C.-C. Emeis danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Prof. Dr. W. Hartmeier danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Allen Mitgliedern des Institutes für Mikrobiologie, der Werkstatt und im Besonderen Frau Dr. M. Hansen, Herrn Dr. J. Dobberstein, Frau Dipl. Biol. E. Bartsch, Herrn Dipl. Biol. M. Molitor und Herrn Dipl. Biol. S. Schillberg danke ich für die gute, freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Dipl. Ing. F. Zimmermann für seine Hilfe bei der Anfertigung der Zeichnungen.

Diese Arbeit ist im Rahmen des DECHEMA/ BMFT Stipendienprogramms für die Biotechnologie gefördert worden. Dafür danke ich den beteiligten Institutionen.