Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 70 (1960)

Artikel: Untersuchung über die celluloseabbauenden Enzyme von Irpex lacteus Fr. und Trichoderma viride Pers. ex Fr.

Autor: Hanstein, Else

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-49490

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 08.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Untersuchung über die celluloseabbauenden Enzyme von Irpex lacteus Fr. und Trichoderma viride Pers. ex Fr.

Von *Else Hanstein*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Eingegangen am 29. Juli 1960

Inhalt

Seite

Einleitung 315

Methoden zur Messung der Enzymaktivität und -spezifität

1. Messung der entstehenden Endprodukte 318
2. Messung des veränderten Ausgangsproduktes: Viscositätsmessungen bei CMC 318

Herstellung der Substrate 319

Bildungsbedingungen von Cellulasen

A. *Irpex lacteus* 321
B. *Trichoderma viride* 326

Herstellung der Enzympräparate

A. *Irpex lacteus* 328
B. *Trichoderma viride* 331

Beeinflussung der Enzymaktivität

Optimum der Wasserstoffionenkonzentration 332
Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit 334
Thermostabilität 336
Abbauprodukte 339
Inhibitoren 342

Substratspezifität der Enzympräparate 345

Versuche über die Natur des Enzymeiweißes 346

Diskussion 347

Zusammenfassung 348

Literatur 350

Einleitung

Cellulose ist im Pflanzenreich in großer Menge verbreitet, selten in reiner Form, z.B. bei den Samenhaaren der Baumwolle, häufiger mit anderen Substanzen vermischt, z.B. beim Holz. Zahlreiche Mikroorganismen, Bakterien und besonders Pilze, sind imstande, Cellulose abzubauen und zu verwerten. Trotz der großen praktischen Bedeutung des Celluloseabbaus, man denke z.B. an die Humusbildung, ist die Kenntnis über die dabei ablaufenden enzymatischen Prozesse noch gering, verglichen mit der ähnlicher Reaktionen. Die Hauptschwierigkeit bei der Untersuchung von Celluloseabbaureaktionen durch Enzyme (der Säureabbau hat in der Natur keine Bedeutung) liegt nicht an den Enzymen, sondern an den Substraten. Cellulose besteht aus Glucosemolekülen, die zum größten Teil 1,4-β-glycosidisch miteinander verbunden sind. Die Kettenlänge wird verschieden angegeben; sie beträgt je nach Herkunft der Cellulose und Bestimmungsmethode 2000–10000 Glucoseeinheiten (Staudinger et al., 1936; Gralén, 1944). Wichtiger noch als die Zusammensetzung ist für den enzymatischen Abbau die räumliche Anordnung der Ketten, die «übermolekulare» Struktur (Husemann und Lötterle, 1950). Man nimmt im allgemeinen an, daß sich die Celluloseketten in der natürlichen Cellulose wenigstens über eine gewisse Länge parallel aneinanderlegen, so daß ein sogenannter Kristallit entsteht, und daß diese kristallinen Phasen (je ca. 50 Å breit und 600 Å lang, ein Glucosemolekül = 5 Å) von amorphen Phasen unterbrochen werden, wobei jedoch zwischen kristallin und amorph nur ein gradueller Unterschied besteht. In der amorphen Phase können verschiedenartige Einschlüsse, auch kürzere Kohlehydratketten gleicher oder ähnlicher Bindung, vorkommen (Frey-Wyssling bereits 1936). Diese übermolekulare Struktur ist submikroskopisch und wurde zunächst durch Röntgenstrahlen und polarisationsoptisch und später mit dem Elektronenmikroskop erforscht. Die amorphe Phase wird durch schwache Säuren viel leichter angegriffen als die kristalline; dasselbe trifft auch für den Abbau durch Enzyme zu.

Es ist noch nicht möglich, gleichartige, unsubstituierte Cellulosen mit einem hohen Durchschnittspolymerisationsgrad (DP) herzustellen (diese zu untersuchen, wäre besonders interessant, da sie den Verhältnissen in der Natur am nächsten kommen). Anderseits setzen exakte Angaben über enzymatische Prozesse im allgemeinen nicht nur definierte Substrate, sondern auch gereinigte Enzyme voraus. Es ist aber bisher erst einmal gelungen, eine Cellulase kristallin herzustellen (Nisizawa, 1955, bei *Irpex lacteus*) und nur in wenigen Fällen eine hochgereinigte Cellulase zu gewinnen (z.B. Whitaker, 1953). Man kennt aber bereits eine Reihe von Faktoren, die die Cellulaseaktivität beeinflussen, so daß es schwierig ist, die Fülle von experimentellen Daten zu vergleichen, die mit den verschiedenartigsten Substraten und Enzymlösungen erhalten wurden.

Die ersten Berichte über Untersuchungen des Celluloseabbaus durch Pilze (es wird im folgenden nur vom pilzlichen Abbau die Rede sein) stammen schon vom Anfang dieses Jahrhunderts (z.B. van Iterson, 1903). Einen wesentlichen Aufschwung nahm die Untersuchung der celluloseabbauenden Enzyme von Pilzen im Zweiten Weltkrieg, als das amerikanische Hauptquartier große Mittel zur Verfügung stellte, um die Ursache der Zerstörung von Zelten und anderen Ausrüstungsgegenständen aus Baumwolle wissenschaftlich zu untersuchen. Seit 1950 ist eine große Zahl von Arbeiten mehrerer Forschungsgruppen veröffentlicht worden.

Man kann sich theoretisch verschiedene Möglichkeiten vorstellen, wie Cellulose enzymatisch zu Glucose abgebaut werden kann.

1. *Mehrere* β-Glucosidasen sind für den Abbau verantwortlich; sie unterscheiden sich durch ihre Spezifität bezüglich der Cellulosekettenlänge. Alle oder einige bauen bis zur Glucose ab oder alle, außer einer Cellobiase, bauen bis zur Cellobiose ab, die ihrerseits von dieser Cellobiase abgebaut wird.

2. *Eine* Cellulase baut Cellulosen von verschiedener Kettenlänge bis zur Glucose ab, oder diese Cellulase baut bis zu Cellobiose ab, und diese wird dann von einer Cellobiase in Glucose gespalten.

3. Von Reese, Siu und Levinson (1950) wurden für den Abbau von natürlicher Cellulose verschiedene Enzymgruppen verantwortlich gemacht. Zunächst sollten durch ein Enzym C_1 Bindungen unbekannter Art gelöst werden; die zweite Gruppe, C_x-Enzyme, wäre nur fähig, nach der Vorbehandlung mit C_1 zu wirken. Diese Theorie ist inzwischen verlassen worden.

Die Abgrenzung der Spezifität nach oben, d.h. die Bestimmung des höchsten DP, den eine Cellulase abzubauen imstande ist, ist schwierig, da bei hohem DP die übermolekulare Struktur eine wichtige Rolle spielt. Die Enzymausscheidung selbst kann von Pilz zu Pilz verschieden und von dessen Wachstumsbedingungen abhängig sein. Die meisten Untersuchungen, die an den verschiedensten Pilzen und mit unterschiedlichen Trennungsmethoden durchgeführt worden sind, deuten darauf hin, daß der cellulolytische Prozeß multienzymatisch abläuft (Miller et Blum, 1956; Gilligan et Reese, 1954; Jermyn, 1956; Reese et Levinson, 1952; Grimes, Duncan et Hoppert, 1957), wobei sich aber die Meinungen scheiden, ob der Abbau durch Cellulasen bis zur Glucose oder nur zur Cellobiose erfolgt. Nur Whitaker (1953) und Kooiman et al. (1953) treten für den unienzymatischen Prozeß ein. Sie untersuchten ebenfalls die Enzymwirkung von *Myrothecium verrucaria* wie Grimes et al. und Gilligan et Reese. Während Whitaker den Abbau bis zur Glucose fand, postuliert Kooiman neben einer Cellulase, die bis zur Cellobiose abbaut, eine zusätzliche Cellobiase.

Im Zusammenhang mit dem Problem der Spezifität steht die Frage nach dem Aktionsmodus der Cellulasen. Wird durch die Enzyme Glucose oder Cellobiose von den Enden längerer Ketten abgespalten (end-splitting), oder erfolgt die Spaltung an beliebigen Stellen der Kette (random-splitting)? Es besteht aber auch die dritte Möglichkeit, daß einzelne Cellulasen nicht nur auf einen DP spezifisch sind, sondern daß sich ihre relative Aktivität mit dem DP ändert. Der Grund kann eine Häufung der Aldehyd-Endgruppen bei mehr abgebauten Substraten sein. Whitaker (1954) fand denn auch, daß die Spaltung von Glucosepolymeren (DP 3–6) durch gereinigte Cellulase von *Myrothecium* zunächst vom Ende und dann immer zufälliger mit steigendem DP erfolgt (siehe auch Whitaker, 1956). Auch andere Forscher (Hash et King, 1954; Norkrans, 1950; Levinson et Reese, 1950; Husemann et Lötterle, 1950) glauben, daß die Spaltung von Cellulosen mit hohem DP nicht an vorbestimmten Stellen erfolgt. Wenn lange Celluloseketten auf diese Weise abgebaut werden, müssen Abbauprodukte von jedem DP entstehen. Der Nachweis solcher Spaltprodukte ist ein Beweis für die Theorie des «random-splitting», doch ist er nicht leicht zu führen. Selbst wenn solche Produkte (z.B. Cellotetraose, Hash et King, 1954) nachgewiesen werden können, besteht immer noch die Möglichkeit, daß sie sekundär durch die Wirkung von Transglucosidasen, aufbauenden Enzymen, entstanden sind. Werden keine solchen Produkte gefunden, so schließt das nicht aus, daß im Laufe des Abbauprozesses solche entstanden wären. Man könnte sich denken, daß Cellulasen, die kürzere Ketten abbauen, entweder in größerer Menge vorliegen oder daß ihre relative Aktivität größer ist als die der anderen Cellulasen. Die kleinen Ketten würden in diesem Fall schneller abgebaut als aufgebaut werden.

Die Anlagerung des Enzymmoleküls an das Substratmolekül ist die Voraussetzung für eine enzymatische Reaktion. Angaben über die Form des Enzymmoleküls lassen Schlüsse auf den Abbaumechanismus zu. Whitaker et al. (1954) fanden, daß ihre gereinigte Cellulase die Form einer Zigarre von ca. 200 Å Länge und 33 Å Breite hat. Das bedeutet, daß ein Enzymmolekül vier Glucoseeinheiten überdecken kann.

In der vorliegenden Arbeit sollen Bildungsbedingungen und Wirkungsmechanismen von Cellulasen verschiedener Pilze untersucht werden. Es wurden zwei systematisch unähnliche Pilze, *Irpex lacteus Fr.*[1] und *Trichoderma viride Pers. ex Fr.*[1], gewählt. Die Cellulasepräparate wurden auf die gleiche Art hergestellt und gereinigt und schließlich gegen die gleichen Substrate getestet. So war es möglich, die Ergebnisse zu vergleichen, was bei Arbeiten von verschiedenen Instituten sonst nur bis zu einem gewissen Grad möglich ist.

---

[1] Vom Centraal Bureau voor Schimmelcultures Baarn (Niederlande). *Trichoderma viride* ist nach Reese (1956) noch aktiver als *Myrothecium verrucaria*.

Methoden zur Messung der Enzymaktivität und -spezifität

Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten, den Einfluß von cellulolytischen Enzymen auf Cellulosen zu untersuchen.

1. Man mißt die durch Enzymwirkung entstehenden Abbauprodukte.
2. Man untersucht, inwiefern sich das Ausgangsmaterial verändert hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Summe der durch Enzymwirkung entstandenen, reduzierenden Gruppen nach Nelson (1944) kolorimetrisch bestimmt. Die Absorption der Lösungen wurde bei 560 mμ mit einem Spektro-Photometer[1] gemessen und die erhaltenen Absorptionswerte direkt als Maß der Aktivität angenommen. Nur in Einzelfällen wurden die nach einer Eichkurve bestimmten Mengen von Glucose oder Cellobiose angegeben. Diese Angaben entsprechen nämlich nicht den tatsächlich vorhandenen Mengen dieser Zucker, da die als «Reduktionswert» angegebene Absorption die Summe *aller* durch reduzierende Gruppen hervorgerufenen Absorptionen darstellt.

Eine qualitative Unterscheidung der durch den Abbau entstehenden Endprodukte wurde papierchromatographisch durchgeführt. 5 ml Versuchslösung werden mit einer Spatelspitze Dowex 90 versehen, 15 Minuten stehengelassen, das Harz abfiltriert und das Filtrat bei 70° in vacuo bis zur Trocknung eingedampft. Der Rückstand wird in 0,2 ml Aqua dest. gelöst. Der reduzierende Wert dieser Lösung entspricht etwa einer 2%-Glucoselösung. Von dieser Lösung werden $2 \times 0{,}01$ ml auf Whatman-Papier Nr. 4 aufgetragen und absteigend chromatographiert. Als Lösungsmittel wird Butanol : Aceton : NH_3 : Wasser im Verhältnis 40 : 50 : 3 : 15 verwendet. Nach 22 Stunden Laufzeit werden die Chromatogramme getrocknet, mit Anisidin-Spray[2] entwickelt und bei 105°C 5 Minuten getrocknet. Cellobiose und Glucose sind sowohl bei Tageslicht als auch im UV deutlich sichtbar. Ist in der Testlösung Carboxymethylcellulose (CMC), so wird die mit Dowex entsalzte Lösung mit 4 ml Methanol versetzt, geschüttelt, die ausgefallene CMC abzentrifugiert und dann erst eingedampft.

Die Veränderung des ursprünglichen Substrates wurde bei CMC viscosimetrisch mit einem Kugelfall-Viscosimeter nach Höppler (Präzisionsmodell) gemessen. Schäfer (1957) stellte fest, daß es zweckmäßig ist, bei Viscositätsmessungen von Lösungen mit fadenförmigen Molekülen zwei Kugeln zu benutzen. Die erste, kleinere Kugel zerstört die Struktur der Lösung, so daß die zweite, größere nachfolgende Kugel immer eine gleichartige Lösung durchfällt. Dadurch ist der erhaltene Viscositätswert

---

[1] Für die Erlaubnis zur Benutzung bin ich der Firma Geigy und Herrn Dr. Wiessmann zu großem Dank verpflichtet.

[2] 0,5 g Anisidin-hydrochlorid und 2 ml Phosphorsäure mit absolutem Alkohol auf 50 m aufgefüllt und filtriert.

zwar keine Materialkonstante mehr, jedoch werden die Meßwerte durch diesen Kunstgriff genau reproduzierbar. Aus Eichkurven kann die jeweilige Konzentration an CMC bestimmt werden. Es ist überdies unmöglich, Stammlösungen von genau der gleichen Viscosität zweimal herzustellen.

Bei der Angabe der Aktivität aus Viscositätsmessungen wurde auf die Umrechnung in Menge CMC verzichtet und als Maß $(t_0 - t_x)/t_0$ genommen. t_0 ist die Fallzeit in einer CMC-Testlösung sofort nach Zugabe des Enzyms, t_x ist die Fallzeit nach einer entsprechenden Reaktionsdauer. Der Faktor $1/t_0$ wurde hinzugefügt, um den Einfluß verschiedener Anfangskonzentrationen von CMC auszuschalten. Besonders bei *p*H-Versuchen war das nötig, da die Viscosität stark vom *p*H abhängt. Die Viscositätsmessungen erfolgten immer bei 20° C.

Die Testlösung, die in dieser Arbeit, wenn nicht anders angegeben, zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet wurde, hatte folgende Zusammensetzung:

Enzymlösung	1 ml
Gelatinelösung[1] (Difco) 0,015%	2 ml
Substrat in verschiedenen Quantitäten Acetatpuffer *p*H 5,5 (zur Konservierung mit Preventol PN gesättigt)	47 ml

Vorversuche ergaben, daß Preventol PN (Bayer) = Dowicide G keinen schädigenden Einfluß auf die Cellulaseaktivität hat, ebenso wie die untersuchten Antiseptica Preventol GD (Bayer), Preventol ON extra (Bayer) und 4-Chlorphenol-Na (Bayer)[2].

Herstellung der Substrate

1. *«Natürliche» Cellulose*

«Baumwolle, Rohlinters „Sidney"»[3] wurden mit einer Handmühle fein gemahlen, durch ein Sieb, Maschengröße 0,2 mm, gegeben, 120 Stunden bei 30° C unter Schütteln mit einem Alkohol-Benzol-Gemisch (2:1 v/v) extrahiert und dann 4 Stunden in vacuo bei 50° C getrocknet.

---

[1] Whitaker (1952) fand, daß die Aktivität von Cellulasen durch Zugabe kleiner Mengen Protein bis zu einem bestimmten Maximalwert gesteigert werden kann. Er glaubt, daß die unterschiedlichen Resultate bei Cellulaseuntersuchungen u.a. auf den verschiedenen Eiweißgehalt der Enzympräparate zurückzuführen seien. Obwohl er nur bei unlöslichen Cellulosen eine Steigerung beobachtete, wurde hier auch bei Verwendung von CMC als Substrat Gelatinelösung zugegeben.

[2] Von der Firma Aktiengesellschaft vorm. Emil Vogel, Zürich, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

[3] Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Firma Wasem & Olbrecht, Papiermühle-Bern.

2. *Walseth-Cellulose I+II* (modifiziert nach Walseth, 1952)

I. Zu 20 g «natürlicher» Cellulose wurden 260 ml H_3PO_4 (85 %) gegeben; diese Mischung blieb 2 Stunden bei 2° C stehen, wurde dann mit Eiswasser ausgewaschen, dann weitere 5 Tage stehengelassen und mit dem Starmix gut verteilt. Da die Reaktion wieder leicht sauer war, wurde noch einmal mit Eiswasser ausgewaschen, bis die *p*H-Werte des Wassers vor und nach dem Waschen übereinstimmten. II wurde nach der Methode Walseth (1952), S. 228, für Cellulose C hergestellt. II ist etwas weniger abgebaut als I.

3. *Alkali-Cellulose,*

hergestellt nach Kooiman et al. (1953) aus «natürlicher» Cellulose. Diese Cellulose ist z.T. kristallin, z.T. amorph; sie wurde in Wasser aufbewahrt und ohne vorheriges Trocknen verwendet. Nach Jørgensen (1950) S. 140, soll der DP durch diese Behandlung wenig abnehmen, der kristalline Anteil der Cellulose jedoch stark verringert werden.

4. *Unlösliche Cellulose-Dextrine (ICD),*

hergestellt nach Kooiman et al. (1953), stark abgebaute Cellulose; wurde ebenfalls in Wasser aufbewahrt.

5. *Lösliche Cellulose-Dextrine (SCD),*

hergestellt nach Kooiman et al. (1953). Noch stärker abgebaut als 4.

6. *Phosphorcellulose I+II,*

leicht modifiziert nach Jørgensen (1950) S. 78, 79. I. 10 g «natürliche» Cellulose wurden zu 752 ml 73,2 %iger Phosphorsäure bei 0° C unter Rühren gegeben und 3 Stunden stehengelassen; dann wurde in kleinen Portionen 85 %ige Phosphorsäure zugegeben, diese Lösung bei 0° C 4 Stunden gerührt, wobei CO_2 darübergelassen wurde, um eine Verdünnung der Lösung durch Wasserdampf zu vermeiden. Anschließend blieb die Lösung 150 Minuten bei 25° C stehen und wurde dann in die vierfache Menge Eiswasser mit Eis im Überschuß gegeben. Die ausgefällte Cellulose blieb in dieser sauren Lösung noch 48 Stunden, wurde dann so lange mit Eiswasser ausgewaschen, bis der *p*H-Wert des Waschwassers der gleiche wie der des zugegebenen Wassers war. Dann wurde das Wasser durch Alkohol und Aceton ersetzt, die Cellulose in vacuo getrocknet und fein verrieben.

II wie I, jedoch nach der Ausfällung in Eiswasser sofort viermal mit Eiswasser ausgewaschen, über Nacht in Wasser bei 0° C stehengelassen und wie I getrocknet.

I ist mehr abgebaut als II, II soll nach Jørgensen einen DP von 730 haben.

7. *Carboxymethylcellulose* (CMC 70, mittelviskös, 100 %)

Produkt der Firma Hercules Powder Company; Substituierungsgrad 0,75.

8. *Reisstärke*

9. *Lösliche Stärke*

10. *Salicin Kerfoot*

11. *Cellobiose*

Die in Wasser suspendierten Substrate wurden mit Toluol konserviert und bei 2° C aufbewahrt.

Da eine Bestimmung des DP aus technischen Gründen nicht möglich war, können nur vergleichende Angaben über den DP der einzelnen Substrate gemacht werden, wobei über den kristallinen bzw. amorphen Anteil nichts ausgesagt werden kann.

Der DP nimmt wahrscheinlich in folgender Reihenfolge ab:

«natürliche» Cellulose, Alcalicellulose, Walseth II, Walseth I, Phosphorcellulose II, Phosphorcellulose I, CMC (?), unlösliche Cellulosedextrine, lösliche Cellulosedextrine, Cellobiose.

Untersuchung über die Bildungsbedingungen der cellulolytischen Enzyme

Es ist von Vorteil, als Ausgangspunkt für die Enzympräparate eine möglichst aktive Kulturlösung zu haben. Daher wurden einige Faktoren untersucht, von denen angenommen werden konnte, daß sie von Einfluß auf die Enzymbildung durch den Pilz sein könnten.

A. *Irpex lacteus*

1. Temperatur

Schüttelkulturen von *Irpex lacteus* (59 Upm) wurden bei 10° C, 20° C, 30° C[1] angesetzt und die Aktivität der Kulturlösung in Abständen von 2 Tagen gemessen. Der Pilz wurde zunächst in Kulturröhrchen auf Haferflockenmalzagar 8 Tage bei 30° C im Dunkeln kultiviert. Anschließend wurden möglichst gleich große Mycelstücke aseptisch entnommen, einzeln

[1] Die Kolben standen in gedämpftem Tageslicht. Versuche haben ergeben, daß solches Licht keinen Einfluß auf die Cellulaseproduktion hat.

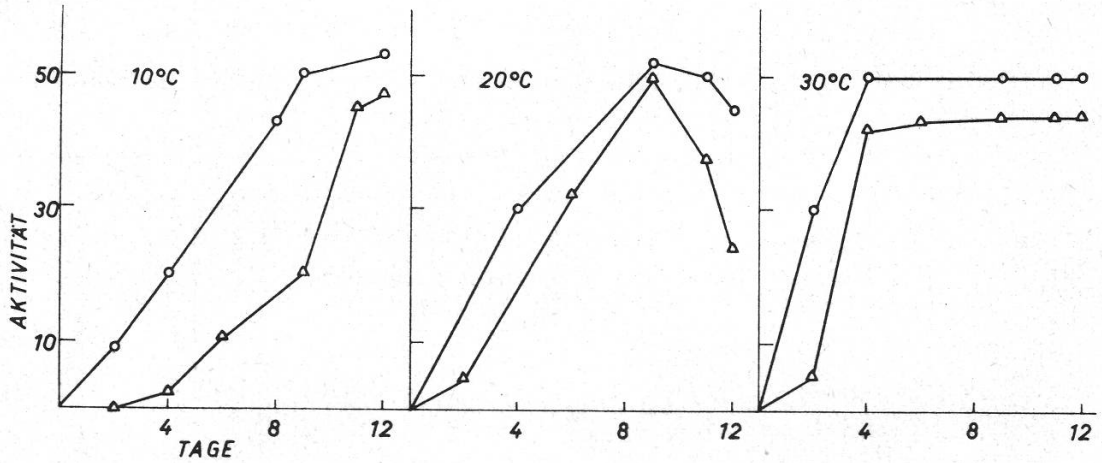
auf 500-ml-Erlenmeyerkolben verteilt, in denen sich 200 ml Nährlösung mit folgender Zusammensetzung befanden:

Cellulosepulver[1]	104,0 g
Milchsäure	5,2 g
NH_4NO_3	20,0 g
K_2HPO_4	10,0 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	2,4 g
Wasser	6000 ml

Nisizawa et al. (1954) fanden diese Nährlösung besonders günstig für die Bildung von Cellulasen.

Der Versuch wurde in zwei parallelen Serien ausgeführt. Die Versuchswerte sind quantitativ nicht vergleichbar, da es nicht möglich ist, genau gleich viel Mycel zu impfen, jedoch kann der allgemeine Verlauf verglichen werden.

Nach 2 Tagen wurden aus diesen Kolben 4–5 ml Lösung steril entnommen und zentrifugiert, um das Zellulosepulver zu entfernen[2]. Je 1 ml dieser Lösungen wurde zu 49 ml der oben aufgeführten Testlösung gegeben, die 0,2 g CMC als Substrat enthielt. Nach Zugabe der Enzymlösung wurde die Änderung der Viscosität und der reduzierende Wert der Testlösung nach 2 Tagen ermittelt (Fig. 1).



Figur 1

Irpex lacteus: Einfluß der Temperatur auf die Bildung cellulolytischer Enzyme in Schüttelkultur und bei gedämpftem Tageslicht
○——○ Viscositätsänderung der Testlösung nach 2 Tagen, $(t_0 — t_{2Tg})\ 100/t_0$
△——△ reduzierender Wert der Testlösung nach 2 Tagen (Beckman-Wert × 100)

---

[1] Bei Nisizawa Filterpapier.

[2] Nach 5–6 Tagen war dies nicht mehr nötig, da der Pilz mit seinem Mycel Kugeln bildete, die alles Cellulosepulver einschlossen, so daß die Kulturlösung klar war.

Man hätte erwarten können, daß mit steigender Temperatur Geschwindigkeit der Enzymbildung und Größe der Enzymaktivität zunehmen würden. Es zeigt sich jedoch, daß nach 4 Tagen die Lösung bei 30° C aktiver ist als diejenige bei 20° C oder 10° C, daß sich aber die Aktivität aller Lösungen dem gleichen Maximalwert nähert. Während dieser Wert bei 30° C nach 4 Tagen erreicht wird und sich dann nicht mehr ändert, nimmt die Aktivität bei 20° C bis zum 10. Tag zu, dann stark ab. Bei 10° C konnte noch nach 12 Tagen ein allerdings schwaches Zunehmen der Enzymaktivität festgestellt werden.

Das Verhältnis Enzymaktivität zu Pilztrockengewicht konnte nicht ermittelt werden, da Mycel und Cellulosepulver nicht zu trennen waren. Nach Beobachtungen von Auge war das Mycelwachstum bei 10° C am Anfang wesentlich geringer als bei 20° C und 30° C; gegen Ende des Versuches konnte kein Unterschied mehr erkannt werden.

Dieses eigenartige Ergebnis könnte erklärt werden, wenn man annimmt, daß sozusagen ein Wettlauf stattfindet zwischen *Enzymbildung*, die vielleicht mit dem Mycelwachstum parallel geht, und *Enzymzerstörung*, bewirkt durch das Schütteln während des Versuches. Auch Basu et Pal (1956) fanden, daß Schütteln während eines Testes schädlich sein kann.

Bei 10° C ist die Zerstörung sehr gering, die Bildung der Enzyme aber auch, woraus eine langsame, aber stetige Zunahme der Enzymaktivität resultiert.

Bei 20° C ist die Enzymzerstörung zunächst geringer als die Enzymbildung. Nach etwa 8 Tagen ist die Zerstörung jedoch wesentlich größer, was eine starke Abnahme der Aktivität zur Folge hat. Bei 30 ° C überwiegt zunächst die Enzymbildung, nach ca. 4 Tagen halten sich Enzymbildung und -zerstörung die Waage, und die Aktivität bleibt infolgedessen gleich.

Um diese Auffassung zu bestätigen, war es nötig, die Abgabe von cellulolytischen Enzymen bei geschüttelten und nichtgeschüttelten Kulturen zu untersuchen.

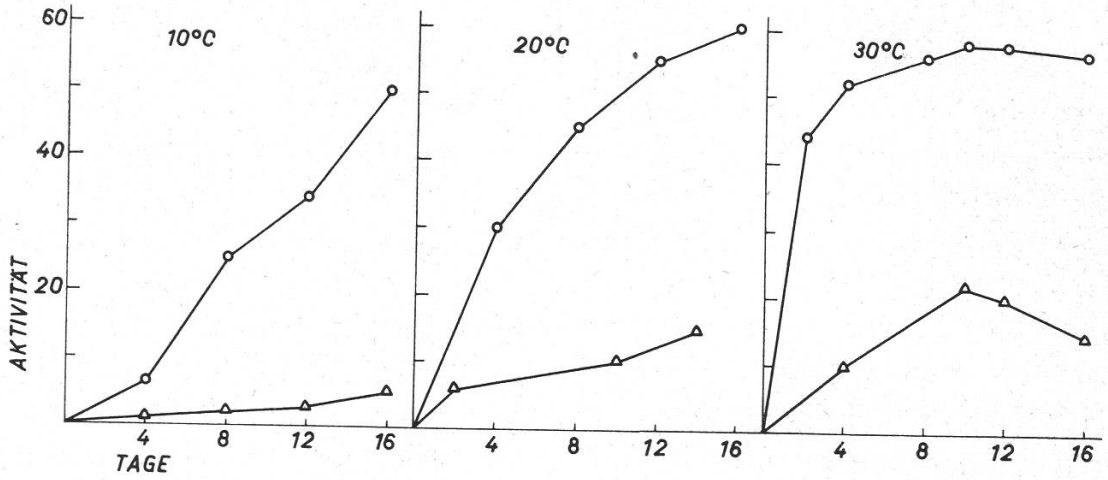
2. Schütteln

Die Anzucht des Pilzes, die Herstellung der Kulturlösung sowie die Aktivitätsmessungen erfolgten wie oben angegeben, nur wurde auf das Schütteln verzichtet.

Das Ergebnis ist aus Figur 2 ersichtlich.

Das Schütteln wirkt wie erwartet enzymzerstörend. In den ungeschüttelten Kolben konnte keine Abnahme der Enzymaktivität beobachtet werden. Das Pilzwachstum wird jedoch durch das Schütteln stark gefördert, was schon Beobachtungen von Auge zeigen (s. a. Tab. 2). Außerdem

wird durch Schütteln besonders die Bildung von Enzymen, die reduzierende Zucker erzeugen, stark begünstigt, wodurch die Existenz von mindestens zwei Enzymen feststeht.



Figur 2

Irpex lacteus: Bildung von cellulolytischen Enzymen bei verschiedenen Temperaturen, Tageslicht und in ungeschüttelter Nährlösung

○——○ Viscositätsänderung der Testlösung nach 2 Tagen, $(t_0 — t_{2\,Tg})\ 100/t_0$

△——△ reduzierender Wert der Testlösung nach 2 Tagen (Beckman-Wert × 100)

Der Grund für die enzymzerstörende oder inaktivierende Wirkung des Schüttelns könnte die erhöhte Berührung der Lösung mit Luftsauerstoff sein. Um dies zu untersuchen, wurde folgender Versuch angesetzt: Gereinigte *Irpex*-Cellulaselösung (siehe S. 328) wurde mit dem Antisepticum Preventol PN versetzt, je 10 ml davon in 50-ml-Erlenmeyerkolben pipettiert, die eine Hälfte zur Entfernung des Luftsauerstoffs mit Stickstoff, der mit Pyrogallol gereinigt war, gefüllt und bei 15° C und 30° C dunkel geschüttelt. Als Kontrolle diente die nichtgeschüttelte, bei 15° C dunkel aufbewahrte Enzymlösung. Nach 20 Tagen wurde von allen Lösungen 1 ml entnommen, zu einer Testlösung (mit CMC) gegeben und die Viscosität nach 5 Minuten bestimmt.

Während sich die nichtgeschüttelte Kontrolle nicht verändert hatte, ergab sich bei den Versuchslösungen folgendes Bild (Tab. 1):

Sowohl bei 15° C als auch bei 30° C in Stickstoff- und Luftatmosphäre bewirkt das Schütteln eine Abnahme der Enzymaktivität. Sie ist bei 30° C höher als bei 15° C. Ersetzt man bei 15° C die Luft durch Stickstoff, so vermindert sich der Aktivitätsverlust von 28 % auf 16 %. Bei 30° C sind die Verhältnisse umgekehrt. Ersetzt man die Luft durch Stickstoff, so erhöht sich der Aktivitätsverlust von 36 % auf 49 %. Damit ist der Luftsauerstoff als alleinige Ursache der Verminderung der Cellulaseaktivität während des Schüttelns ausgeschaltet.

Tabelle 1

Irpex lacteus: Einfluß aerober und anaerober Verhältnisse auf die Cellulaseaktivität

Temperatur	Gasatmosphäre über der Lösung	% Aktivitätsverlust gegenüber der ungeschüttelten Kontrolle[1]
15° C	N_2	16,2
15° C	Luft	27,75
30° C	N_2	48,7
30° C	Luft	35,8

Die Cellulaselösung wurde mit dem betreffenden Gasgemisch geschüttelt
[1] Mittel aus 2 Messungen.

3. *Kohlenstoffquelle*

Es stellt sich die Frage, inwieweit die Art der Kohlenstoffquelle, die dem Pilz zur Verfügung steht, Einfluß auf dessen Produktion an cellulolytischen Enzymen hat, d.h. mit anderen Worten: Bildet der Pilz nur in Gegenwart des abzubauenden Substrates das oder die entsprechenden Enzyme (die Enzyme sind dann adaptiv), oder ist die Enzymbildung von der vorhandenen Kohlenstoffquelle unabhängig (nichtadaptive Enzyme)?

Über diesen Punkt liegen einige sich z.T. widersprechende Untersuchungsergebnisse vor. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die Fähigkeit zur Produktion von z.B. adaptiven cellulolytischen Enzymen nur bei bestimmten Organismen vorliegt, daß andere dagegen nichtadaptive Enzyme ausscheiden. Außerdem kann man sich vorstellen, daß verschiedenartige cellulolytische Enzyme sich auch in diesem Punkt unterscheiden.

Nichtadaptive Enzyme, die CMC abbauen, fand Jermyn bei *Aspergillus oryzae* und *Stachybotrys atra* (Jermyn, 1952a und 1953). Im Gegensatz dazu konnte Thomas (1956) beim gleichen Organismus *(Stachybotrys)* eine wahrscheinlich adaptive Cellulase, gegen CMC getestet, feststellen. Er fand auch in Pilzkulturen, die als Kohlenstoffquelle nur Glucose enthielten, nur eine β-Glucosidase (Test gegen p-Nitrophenyl-β-Glucosid). Auch Reese et al. (1952a), die eine große Zahl von Pilzen ganz verschiedener systematischer Zugehörigkeit untersuchten, fanden mit einer einzigen Ausnahme *(Aspergillus luchuensis)* keinen Pilz, dessen cellulolytische Enzyme nicht adaptiv gewesen wären. Die Resultate von Norkrans (1957) bei *Polyporus annosus* decken sich mit denen von Reese und Thomas. Schäfer (1957) findet für *Aspergillus terreus*, daß cellulolytische Aktivität auch bei Glucose als Kohlenstoffquelle auftritt, allerdings in viel geringerem Maße als bei CMC. Der Begriff der adaptiven Enzymbildung ist vielleicht überhaupt quantitativ aufzufassen.

Eigene Untersuchungen an *Irpex lacteus* bestätigten die Ergebnisse von Norkrans, Reese und Thomas.

Der Versuch wurde wie oben angegeben angesetzt mit dem Unterschied, daß das Cellulosepulver der Kulturlösung durch die gleiche Menge Glucose ersetzt wurde. Die Untersuchungen wurden bei 10° C, 20° C, 30° C durchgeführt und eine Hälfte der Versuchskolben geschüttelt, um gleichzeitig den wachstumsfördernden Einfluß des Schüttelns durch Trockengewichtsbestimmungen ermitteln zu können.

Die Versuche zeigten, daß auf Glucose praktisch keine Enzyme gebildet werden, die die Viscosität der CMC herabsetzen. Die geringe Aktivität in den ersten 4–6 Tagen ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß beim Impfen von *Irpex*-Mycel immer Spuren des cellulosehaltigen Haferflockenmalzagars mitkommen.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde das Mycel auf gewogene Filter genutscht und bei 50° C 3 Tage getrocknet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

Irpex lacteus: Einfluß von Schütteln und verschiedenen Temperaturen auf das Myceltrockengewicht

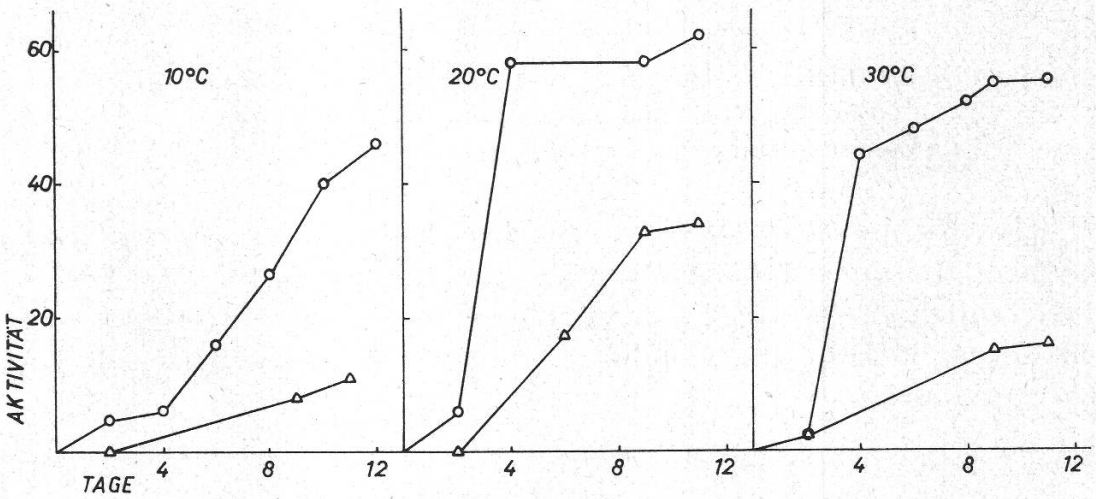
Temperatur	Behandlung	mg Trockengewicht
10° C	schütteln	816
10° C	nicht schütteln	283
20° C	schütteln	6050
20° C	nicht schütteln	495
30° C	schütteln	3095
30° C	nicht schütteln	413

Dadurch, daß mit verschieden großen Mycelstücken geimpft werden mußte, sind zwar keine direkten quantitativen Vergleiche möglich; daß die geschüttelten Kolben bedeutend mehr Mycel enthalten, ist jedoch offensichtlich.

B. *Trichoderma viride*

Analog zu den Versuchen mit *Irpex lacteus* wurden Versuche über die Bildungsbedingungen cellulolytischer Enzyme bei *Trichoderma viride*

durchgeführt. Anzucht und Kultur des Pilzes sind im Kapitel «Herstellung der Enzympräparate» beschrieben. Die Versuchsanordnung zur Untersuchung der Faktoren Temperatur, Schütteln und C-Quelle war die gleiche wie bei *Irpex*. Unterschiede in der Belichtung haben zwar einen Einfluß auf die Sporenbildung, nicht aber auf die Cellulaseausschüttung.



Figur 3

Trichoderma viride: Einfluß der Temperatur auf die Bildung cellulolytischer Enzyme in Schüttelkultur und bei Tageslicht

○——○ Viskositätsänderung der Testlösung nach 2 Tagen, $(t_0 — t_{2\,Tg})\ 100/t_0$

△——△ reduzierender Wert der Testlösung nach 2 Tagen (Beckman-Wert × 100)

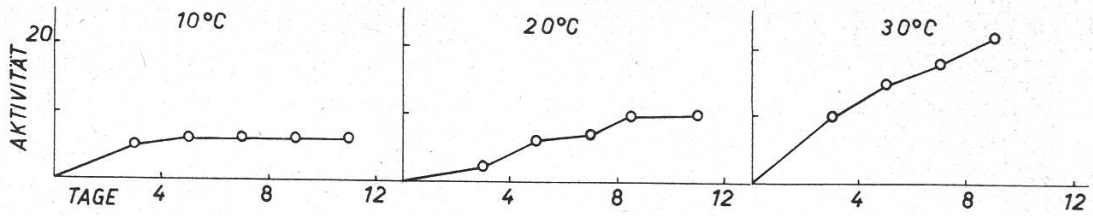
1. Temperatur

Das Ergebnis ist aus Figur 3 zu ersehen.

Da die beiden Pilze auf verschiedene Art geimpft worden sind, sind quantitative Vergleiche nicht möglich. Der Verlauf der Kurven ist jedoch wesentlich anders als bei *Irpex lacteus*. Als wichtigster Unterschied fällt auf, daß sich zwar die Cellulasebildung bei 20° C und 30° C einem Grenzwert nähert, daß jedoch keine Abnahme beobachtet werden kann. Das Schütteln hat also in diesem Fall keine inaktivierende Wirkung. Das kann auf die Verschiedenheit der *Irpex*- und *Trichoderma*-Cellulasen zurückzuführen sein oder darauf, daß die Cellulasen in der *Trichoderma*-Lösung «geschützt» vorliegen. Welche von beiden Möglichkeiten hier vorliegt, kann bei dieser Versuchsanordnung nicht ermittelt werden. Zur Sicherheit wurde wie bei *Irpex* ein Versuch angesetzt, um den Einfluß des Schüttelns zu untersuchen.

2. Schütteln

Es ergab sich bei den geschüttelten Kolben kein anderes Bild als bei den ungeschüttelten, jedoch war wie bei *Irpex* quantitativ ein großer Unterschied festzustellen (Figur 4).



Figur 4

Trichoderma viride: Bildung von cellulolytischen Enzymen bei verschiedenen Temperaturen, Tageslicht und in ungeschüttelter Nährlösung
○——○ Viscositätsänderung der Testlösung nach 2 Tagen, $(t_0 — t_{2Tg})\ 100/t_0$

Selbst nachdem der Pilz 9 Tage bei 30° C gewachsen war, war der Enzymgehalt seiner Kulturlösung so gering, daß beim CMC-Test keine reduzierenden Zucker und nur eine geringe Viscositätsänderung festgestellt werden konnte. Das Wachstum des Pilzes war wie bei *Irpex* wesentlich vermindert.

3. Kohlenstoffquelle

Versuche über den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Bildung cellulosespaltender Enzyme bei *Trichoderma viride* zeigten, daß auch dieser Pilz nur dann solche Enzyme bildet, wenn in seiner Kulturlösung das entsprechende Substrat vorhanden ist. Da dieser Pilz mit einer Sporensuspension geimpft werden konnte, trat auch zu Anfang des Versuches kein entsprechendes Enzym auf (siehe dagegen bei *Irpex*).

Herstellung der Enzympräparate

A. *Irpex lacteus*

Um reichlich Mycel zu bekommen, wurde der Pilz zunächst auf Haferflockenmalzagar in Kulturröhrchen 1 Woche bei 30° C im Dunkeln kultiviert. Dann wurden Mycelstückchen aseptisch in 1-l-Erlenmeyerkolben zu 300 ml Nährlösung (nach Nisizawa, 1955) gegeben und diese Kolben bei 30° C und Tageslicht 4 Tage mit 59 Upm geschüttelt. Durch diese Behandlung konnte in kurzer Zeit eine relativ aktive Enzymlösung erhalten werden. Nachdem das Mycel durch Abnutschen entfernt worden war, wurde das klare Filtrat im Wasserbad (Badtemperatur 40° C) bei einer Destillationstemperatur von 18–20° C und Hochvakuum im Verhältnis 1 : 8 eingeengt[1]. Trotz der schonenden Behandlung war mit dieser Operation ein Aktivitätsverlust von 65% verbunden (Test gegen CMC, Visco-

[1] Für das Einengen bin ich Herrn Dr. Gloor (Hoffmann-La Roche) zu großem Dank verpflichtet.

sitätsänderung nach 10 Minuten). Es wurde daher versucht, die Lösung auf andere Art mit geringerem Verlust einzuengen.

In 1,5-l-Bülacher-Gläser (grünes Glas) wurde 1 l filtrierte Kulturlösung gegeben, die Gläser verschlossen und umgekehrt in eine mit Watte isolierte Kiste gestellt, die 24 Stunden bei —20° C gehalten wurde. Während des Ausfrierens sinkt die schwerere konzentrierte Lösung nach unten an den Deckel des Glases, sie kann, da sie nach 24 Stunden noch nicht gefroren ist, leicht ausgeschüttet und so vom Eis getrennt werden. Dadurch konnte eine Aktivitätszunahme des Konzentrates gegenüber dem Eis von 27% erreicht werden. Da diese Methode umständlich und der Erfolg relativ gering ist, wurde sie in späteren Untersuchungen nicht mehr verwendet.

Viele Enzyme lassen sich mit Salzen reversibel fällen. Das wird oft zur schonenden Konzentrierung wäßriger Enzymlösungen benutzt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit Aussalzen durch $(NH_4)_2SO_4$ unternommen. 100 ml des durch das Ausfrieren erhaltenen Konzentrates wurden mit 40 g $(NH_4)_2SO_4$ versetzt und 24 Stunden bei 2° C stehengelassen. Anschließend wurde die Lösung mit dem ausgefallenen Eiweiß in eine Chromatogrammsäule gegeben (2 × 20 cm, Füllung Alox nach Woelm, neutral, Aktivitätsstufe I), wodurch alles Eiweiß an Alox absorbiert wurde. Die klare durchgelaufene Lösung hatte gegenüber CMC keine Aktivität mehr. Dann wurde das Alox mit 60 ml Wasser versetzt, kräftig geschüttelt und abfiltriert. Beim Filtrat konnte gegenüber der ursprünglichen Lösung eine Aktivitätsverminderung von 27% beobachtet werden. Es besteht die Möglichkeit, daß das Enzym durch die Absorption an Aktivität verloren hat oder daß es so fest absorbiert wurde, daß es mit 60 ml Wasser nicht vollständig eluiert werden konnte. Es wurde daher in der Folge nur noch eine Konzentrierung durch Wasserbad und Hochvakuum vorgenommen.

Die Konzentrate weisen einen hohen Salzgehalt auf. Sie wurden daher zwei Tage lang bei 2° C mit einer Goldschläger-Membran gegen Phosphatpuffer *p*H 5 dialysiert[1]. Die Aktivität war nach der Dialyse die gleiche wie vorher.

Um die dialysierte konzentrierte Kulturlösung weiter zu reinigen und von nichtenzymatischem Eiweiß zu befreien, wurden mehrfach Fällungen mit Aceton verschiedener Konzentration ausgeführt (modifiziert nach Nisizawa, 1955). Das Arbeitsschema ist aus Tabelle 3 zu ersehen. Die Fällungen wurden bei 2° C ausgeführt, die Lösungen bei 2° C und 3000 Upm zentrifugiert[2]. Die letzte überstehende Lösung wurde in dieser Arbeit als «gereinigte Enzymlösung» von *Irpex lacteus* bezeichnet.

---

[1] Cellophanhülsen sind für diesen Zweck nicht geeignet, weil sich die Enzyme zunächst an die cellulosehaltige Membran anlagern und sie dann zerstören.

[2] Für die Erlaubnis zur Benutzung der Kühlzentrifuge «Magnum Refrigerator» danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Tomcsik (Bakteriologische Anstalt Basel).

Tabelle 3

Irpex lacteus: Reinigung der Cellulasen durch die Acetonfällung

Ausgangsprodukt	*Reinigungsmaßnahmen*
1. 150 ml dialysiertes Konzentrat	+ Aceton 68 % und zentrifugieren
2. Niederschlag	lösen in 100 ml H_2O und zentrifugieren
3. Überstehende Lösung	+ Aceton 50 % und zentrifugieren
4. Überstehende Lösung	+ Aceton 63 % und zentrifugieren
5. Niederschlag	lösen in 100 ml H_2O und zentrifugieren
6. *Überstehende Lösung* Gereinigte Ausgangslösung für Versuche	

Ein Teil der konzentrierten Lösung sowie der gereinigten Enzymlösung wurden der Gefriertrocknung unterworfen[1] und bei 2° C über $CaCl_2$ im Dunkeln aufbewahrt. Sowohl durch das Gefriertrocknen als auch durch diese Art der Aufbewahrung trat kein Aktivitätsverlust auf. Für die weiteren Untersuchungen wurde teils die mit Toluol oder Preventol PN konservierte Lösung, teils eine aus der entsprechenden Menge Trockensubstanz hergestellte wäßrige Lösung verwendet.

Um den Erfolg der Acetonfällung sehen zu können, wurden neben Aktivitätsmessungen (gegen CMC, Viscositätsänderung nach 10 Minuten) Proteinbestimmungen nach Lowry et al. (1951) an den gefriergetrockneten Präparaten der konzentrierten Kulturlösung und der gereinigten Enzymlösung durchgeführt (Tabelle 4).

Tabelle 4

Irpex lacteus: Cellulaselösung vor und nach der Acetonfällung
(Von 450 ml auf 300 ml eingeengt)

	Aktivität		mg Protein		Aktivität/mg Protein	
Konzentrat	7570	100 %	805	100 %	9,4	100 %
Gereinigte Lösung	4380	58 %	69	8,6 %	63,5	676 %

Aus Tabelle 4 ist zu ersehen, daß die Aktivität der gesamten Lösung um 42 % abnimmt. Die gesamte Proteinmenge der gereinigten Enzymlösung beträgt aber nur noch 8,6 % der Proteinmenge des Konzentrats. Die Aktivität pro mg Protein ist also von 9 auf 64 gestiegen, d.h. ein Milligramm des gereinigten Enzyms hat die gleiche Aktivität wie 7 mg Protein der konzentrierten Kulturlösung; mindestens 85 % des ursprüng-

[1] Ausgeführt am Kinderspital Basel mit der freundlichen Erlaubnis von Herrn Prof. Dr. Berger.

lich in der Lösung vorhandenen Proteins sind also nichtenzymatischer Natur.

B. *Trichoderma viride*

Im Gegensatz zu *Irpex lacteus* wuchs *Trichoderma viride* auf Haferflockenmalzagar nicht gut[1], dagegen entwickelte er sich auf gelben Rüben zufriedenstellend. Ca. 5 cm lange und 1 cm dicke Rübenstückchen wurden mit ca. 5 ml H_2O in Kulturröhrchen gegeben, sterilisiert und dann mit Sporen des Pilzes beimpft. Nach 8 Tagen Kultur bei 30° C im Dunkeln war die Sporenbildung so fortgeschritten, daß mit sterilem H_2O eine Sporensuspension hergestellt werden konnte, mit der die eigentlichen Kulturkolben (1-l-Erlenmeyerkolben) beimpft wurden.

Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung (modifiziert nach Whitaker, 1953):

Cellulosepulver	30,0 g
NH_4NO_3	0,6 g
$NaNO_3$	3,8 g
KH_2PO_4	0,2 g
K_2HPO_4	0,15 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2,0 g
Na_2HPO_4	1,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
A-Z-Lösung	1 ml
mit H_2O aufgefüllt auf	1000 ml

Nachdem der Pilz bei 30° C und Tageslicht 16 Tage unter Schütteln (59 Upm) kultiviert worden war, wurde das Mycel abfiltriert und die klare Lösung eingeengt und dialysiert, wie bei *Irpex* angegeben ist. Auch die Acetonfällung wurde nach demselben Schema wie bei *Irpex* ausgeführt. Außerdem wurden ebenfalls Proteinbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5

Trichoderma viride: Cellulaselösung vor und nach der Acetonfällung
(Von 300 ml auf 200 ml eingeengt)

	Aktivität		mg Protein		Aktivität/mg Protein	
Konzentrat	9450	100 %	3280	100 %	2,9	100 %
Gereinigte Lösung	5400	57 %	335	10 %	16,1	556 %

[1] Auch auf Celluloseagar (100 ml Nährlösung mit 2 g Agar autoklaviert) war das Wachstum nicht befriedigend.

Mit einem Aktivitätsverlust von 43 % ist eine Verminderung der gesamten Proteinmenge um 90 % verbunden. Die Aktivität pro mg Protein steigt von 3 auf 16, d.h. ein Milligramm gereinigtes Protein hat dieselbe Aktivität wie 5,5 mg Protein des dialysierten Konzentrats. Die Acetonfällung hat also bei *Trichoderma* etwa denselben Reinigungseffekt wie bei *Irpex*.

Wie bei *Irpex* wurde auch bei *Trichoderma* die durch Acetonfällung erhaltene Lösung zu allen weiteren Untersuchungen verwendet.

Untersuchung über die Beeinflussung der Enzymaktivität

Optimum der Wasserstoffionenkonzentration

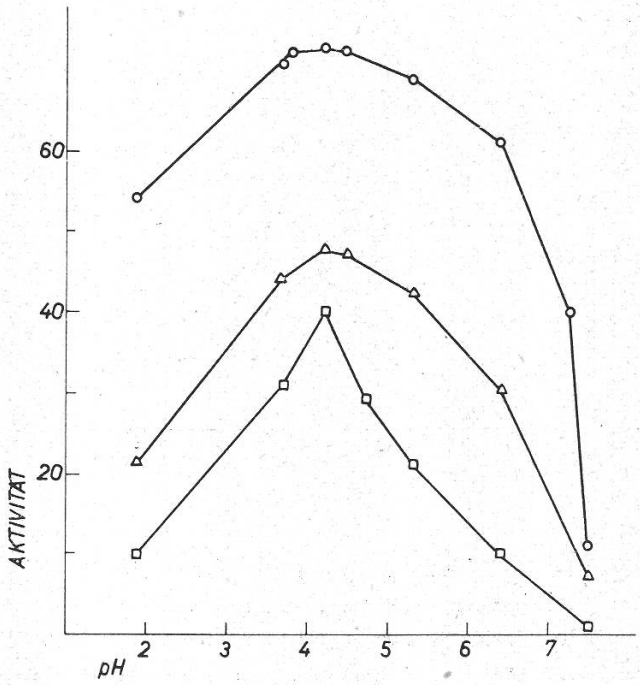
Die katalytische Wirkung eines Enzyms ist meist auf einen relativ kleinen *p*H-Bereich beschränkt. Das optimale *p*H ist im allgemeinen für jedes Enzym eine charakteristische Größe. Liegt ein Enzymgemisch vor, so zeigt sich das unter anderem darin, daß die *p*H-Aktivitätskurve entweder ein sehr breites Optimum oder eventuell sogar zwei Gipfel aufweist.

Über das optimale *p*H von Cellulase oder Cellulasen liegen zahlreiche, stark differierende Ergebnisse vor. Das ist bei dem verschiedenen Reinheitsgrad der untersuchten Enzymlösungen und der unterschiedlichen Testdauer nicht verwunderlich. Greathouse (1950) Saunders et al. (1948) und Kooiman (1957) untersuchten das *p*H-Optimum der cellulolytischen Enzyme des Pilzes *Myrothecium verrucaria*. Greathouse stellte ein Optimum bei *p*H 5,0 fest, Saunders et al., die die rohe Kulturlösung untersuchten und die Aktivität auf Baumwolle nach 4 Tagen maßen, fanden das Optimum bei *p*H 5,5, während Kooiman, der mit einer durch Ammoniumsulfat gereinigten Lösung arbeitete, ein solches bei *p*H 6,0 feststellte. Wurde die Cellobiase durch Erhitzen inaktiviert, so stieg das Optimum auf *p*H 6,5. Daß die Dauer der H-Ionen-Einwirkung eine Rolle spielt, fand Norkrans (1957) bei *Polyporus annosus* bei einer β-Glucosidase. Das *p*H-Optimum stieg von 3,6 bei einer Testdauer von 5 Minuten auf 4,0 bei 60 Minuten Dauer. Für eine Cellulase aus dem gleichen Pilz betrug das *p*H-Optimum bei einer Testdauer von 4 Stunden 5,8. Im gleichen Bereich liegen die Ergebnisse von Toyana (1953) 1954, bei *Trichoderma koningii* mit *p*H 5,0 für eine rohe Kulturlösung und *p*H 4,0–4,4 für eine mit Ammoniumsulfat gereinigte Lösung.

Von diesen Resultaten sehr abweichende Ergebnisse wurden von Sison et al. (1958b) und Thomas (1956) gefunden. Sison et al. fanden für eine stark gereinigte Cellulaselösung von *Poria vaillantii* ein *p*H-Optimum von 3,2 bei 30 Minuten Testdauer. Im Gegensatz hierzu liegt nach Thomas für eine gereinigte Cellulaselösung von *Stachybotrys atra* das *p*H-Optimum

bei 7,0 (16 Stunden Testdauer) und sogar bei 8,0 (15 Minuten Testdauer). Bei diesem *p*H fanden sowohl Norkrans (1957) als auch die Verfasserin überhaupt keine Aktivität mehr.

Eigene Untersuchungen wurden mit gereinigten *Irpex*- und *Trichoderma*-Cellulasen ausgeführt. Für *p*H 1,1–4,0 wurde Zitronensäure-HCl-Puffer, für *p*H 3,0–7,8 Phosphatpuffer verwendet[1]. Maß für die Aktivität der Enzyme bei den bestimmten *p*H war die Abnahme der Viscosität der Testlösung nach 150 Minuten und 2 Tagen und der Reduktionswert der nach 2 Tagen gebildeten Zucker. Das *p*H der Testlösung, das nicht genau dem *p*H des zugegebenen Puffers entsprach, da Gelatine, CMC und Enzym in Acetatpuffer *p*H 5 gelöst waren, wurde mit einer Glaselektrode gemessen (Beckman-*p*H-Meter, Modell G).



Figur 5

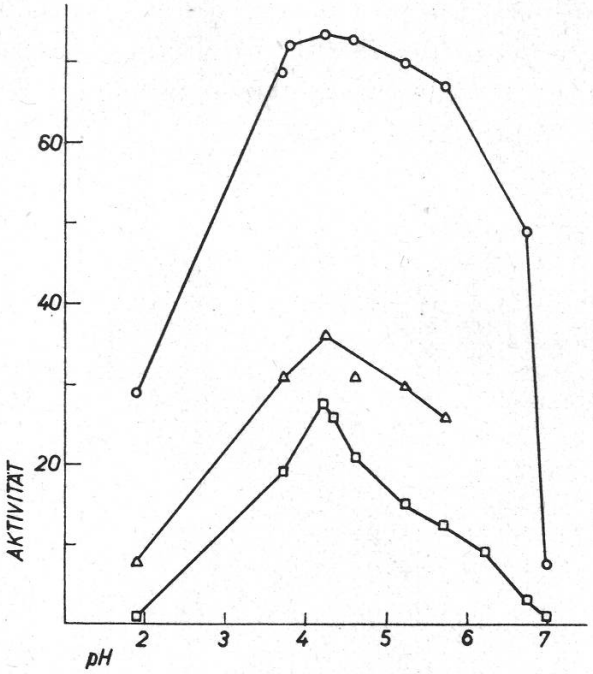
Irpex lacteus: Einfluß der Konzentration an Wasserstoffionen auf die cellulolytische Aktivität des gereinigten Enzympräparates
○——○ Viskositätsänderung der Testlösung nach 2 Tagen, $(t_0 — t_{2Tg})\ 100/t_0$
△——△ Viskositätsänderung der Testlösung nach 150 Minuten, $(t_0 — t_{150\,min})\ 100/t_0$
□——□ reduzierender Wert der Testlösung nach 2 Tagen (Beckman-Wert × 100)

Die *p*H-Optimum-Kurve gereinigter *Irpex*-Cellulase zeigt Figur 5: aus ihr ist zu sehen, daß 1. das Optimum sowohl bei 150 Minuten als auch bei 2 Tagen Testdauer 4,1 beträgt. Dieses Ergebnis liegt tiefer als die Optima der meisten anderen Cellulaselösungen mit Ausnahme jener von

[1] Diese Puffer wurden statt des Acetatpuffers (*p*H 5) zur üblichen Testlösung mit 0,2 g CMC als Substrat gegeben.

Poria vaillantii (*p*H 3,2, Sison et al., 1958b). 2. Bei *p*H 7,2 ist bei nur 150 Minuten Testdauer die Aktivität beinahe auf Null gesunken.

Es ist auffällig, daß die *Trichoderma*-Cellulase genau dasselbe *p*H-Optimum aufweist (Figur 6). Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei *Irpex lacteus*. Diese auffällige Übereinstimmung der *p*H-Aktivitätskurven legt die Vermutung nahe, daß die Pilze trotz ihrer systematischen Verschiedenheit ähnliche cellulolytische Enzyme ausscheiden. Die Aktivität nimmt wie bei *Irpex lacteus* bei *p*H-Werten über 7 rapid ab.



Figur 6

Trichoderma viride: Einfluß der Konzentration an Wasserstoffionen auf die cellulolytische Aktivität des gereinigten Enzympräparates

○——○ Viscositätsänderung der Testlösung nach 2 Tagen, $(t_0 — t_{2\,Tg})\ 100/t_0$

△——△ Viscositätsänderung der Testlösung nach 150 Minuten, $(t_0 — t_{150\,min})\ 100/t_0$

□——□ reduzierender Wert der Testlösung nach 2 Tagen (Beckman-Wert × 100)

Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Die optimale Reaktionstemperatur ist kein unveränderliches Charakteristikum eines Enzyms, sie ist je nach Umstand und Dauer der Reaktion sehr verschieden. Wie bei allen chemischen Reaktionen, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Temperatur zu. Gleichzeitig nimmt die katalytische Wirkung ab, weil mit Zunahme der Temperatur das Enzym, speziell sein Proteinkomplex, geschädigt wird. Enzyme sind also bei niederer Temperatur am trägsten und am beständigsten.

Die Ergebnisse von Untersuchungen über die optimale Reaktionstemperatur von Cellulasen sind sehr verschieden. Das kommt daher, daß

die untersuchten Lösungen in Zusammensetzung und Reinheitsgrad differieren und daß außerdem sehr verschiedene Reaktionszeiten (von 5 Minuten bis zu mehreren Tagen) angewandt wurden. Bei nichtlöslichen Cellulosepräparaten ist der Abbau oft erst nach längerer Zeit überhaupt meßbar; dies ist einmal durch den besonderen Aufbau der Substrate bedingt und zum anderen vielleicht durch die geringe Aktivität selbst hochgereinigter Cellulaselösungen gerade diesen hochpolymeren Substraten gegenüber. Es ist daher nicht verwunderlich, daß das Temperaturoptimum in diesem Falle nicht über 30–40° C liegt.

Eine Übersicht einiger neuerer Untersuchungen zeigt deutlich, daß das Temperatur-Optimum bei Untersuchungen mit der kürzesten Testdauer am höchsten liegt.

Tabelle 6

Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse über die optimale Reaktionstemperatur cellulolytischer Enzyme

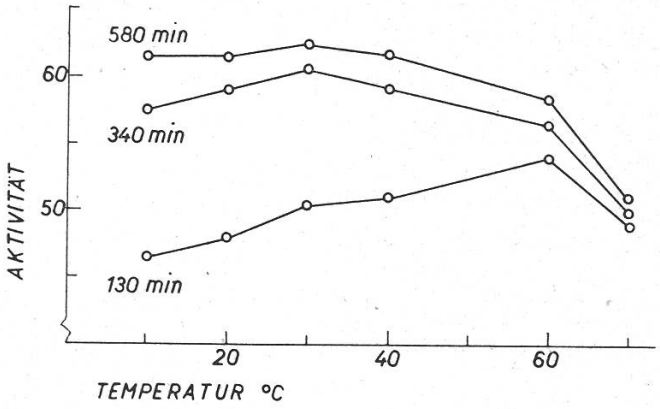
Pilz	Enzymlösung	Testdauer	Substrat	Optimum	Autor
Poria vaillantii	gut gereinigt	30 Minuten	CMC	60° C	Sison et al. (1958b)
Myrothecium verrucaria	erhitzt	5+15 Minuten	CMC	42–45° C	Norkrans (1957)
Myrothecium verrucaria	nicht erhitzt	10 Minuten	CMC	55° C	Norkrans (1957)
Myrothecium verrucaria	nicht gereinigt	4 Tage	Papier	40° C	Saunders et al. (1948)
Myrothecium verrucaria	nicht gereinigt	?[1]	Baumwolle	40° C	Greathouse (1950)
Trichoderma konongii	?	?	?[2]	40–45° C	Toyana (1954)

[1] Wahrscheinlich Tage, da die Aktivität gegen Baumwolle im allgemeinen gering ist.

[2] Leider sind die Arbeiten im Original japanisch und deshalb nur aus den «Chemical Abstracts» zu lesen. Dies ist auch wahrscheinlich der Grund, warum sie nie zitiert werden.

Die eigenen Untersuchungen wurden an den gereinigten Cellulaselösungen von *Irpex lacteus* und *Trichoderma viride* durchgeführt. Die Viscosität der üblichen CMC-Testlösungen wurde immer bei 20° C gemessen, die Testkolben sofort nach der Messung auf die Reaktionstemperatur gebracht und nach Beendigung der Reaktionszeit für die nächste Messung

wieder abgekühlt bzw. erwärmt. Die Ergebnisse für *Irpex lacteus* sind in Figur 7 graphisch dargestellt.



Figur 7

Irpex lacteus: Temperaturabhängigkeit der Aktivität gereinigter Cellulase auf CMC nach verschieden langer Testdauer
○——○ Viscositätsänderung nach verschiedenen Zeiten

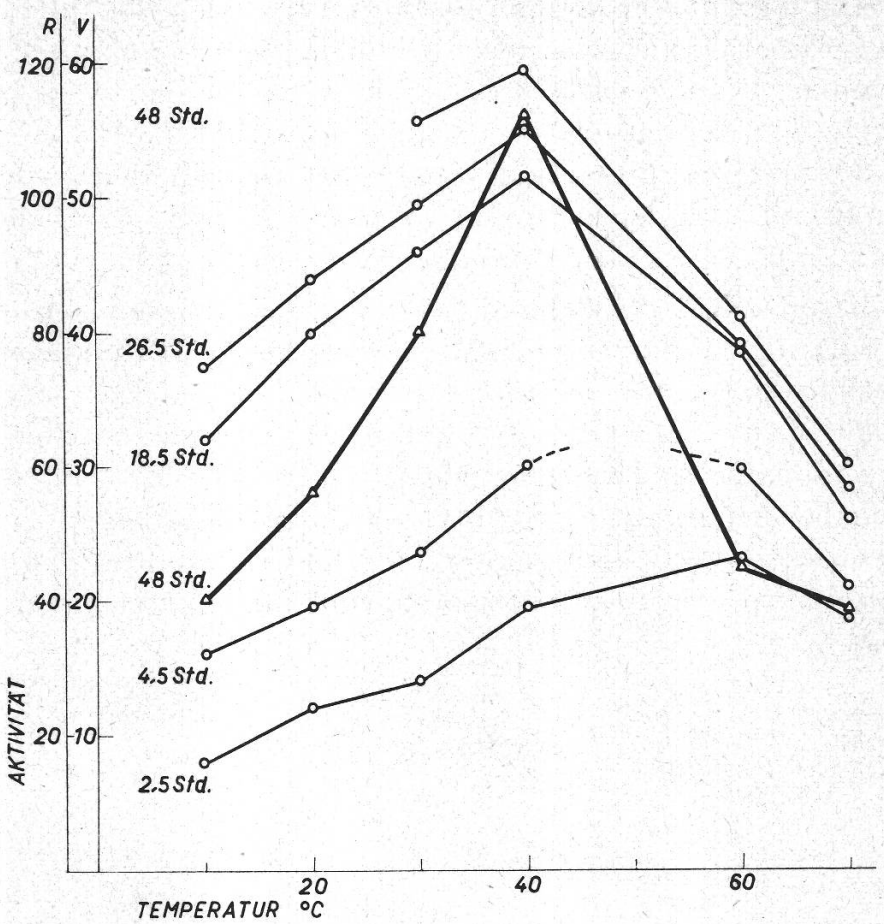
Bei einer Reaktionsdauer von 130 Minuten beträgt die optimale Reaktionstemperatur 60° C, was dem Ergebnis von Sison et al., 1958b, entspricht. Wird die Reaktionsdauer auf 340 Minuten und schließlich auf 580 Minuten erhöht, so verschiebt sich das Optimum bis auf 30° C.

Es fällt außerdem noch auf, daß die Aktivitätskurven ein sehr breites Optimum haben. Das kann einmal davon herrühren, daß die Enzymlösung immer noch aus einigen Cellulasen, die sich hinsichtlich des Temperaturoptimums ähnlich verhalten, besteht. Es kann aber auch dadurch zustande kommen, daß die Lösung während der Viscositätsmessungen einige Zeit, wenn auch nur kurz, nicht auf der angegebenen Reaktionstemperatur ist.

Ein etwas anderes Bild zeigen die auf die gleiche Art mit gereinigter *Trichoderma*-Cellulase durchgeführten Untersuchungen (Figur 8). Zusätzlich wurden in diesem Fall nach 2 Tagen Zuckerbestimmungen in der Testlösung gemacht (kolorimetrisch nach Nelson, 1944). Zwar beträgt das Optimum für 150 Minuten Testdauer auch 60° C, aber selbst nach 2 Tagen liegt die optimale Reaktionstemperatur immer noch bei 40° C. Die Aktivitätskurven sind bei *Trichoderma* viel steiler als bei *Irpex*. Das kann auf einen größeren Reinheitsgrad oder auf eine andere Zusammensetzung der Enzymlösung hindeuten.

Thermostabilität

Im Zusammenhang mit der optimalen Reaktionstemperatur sind Untersuchungen über die Hitzestabilität von Cellulasen interessant. Auch die thermische Inaktivierung gibt Aufschluß über die chemische Natur



Figur 8

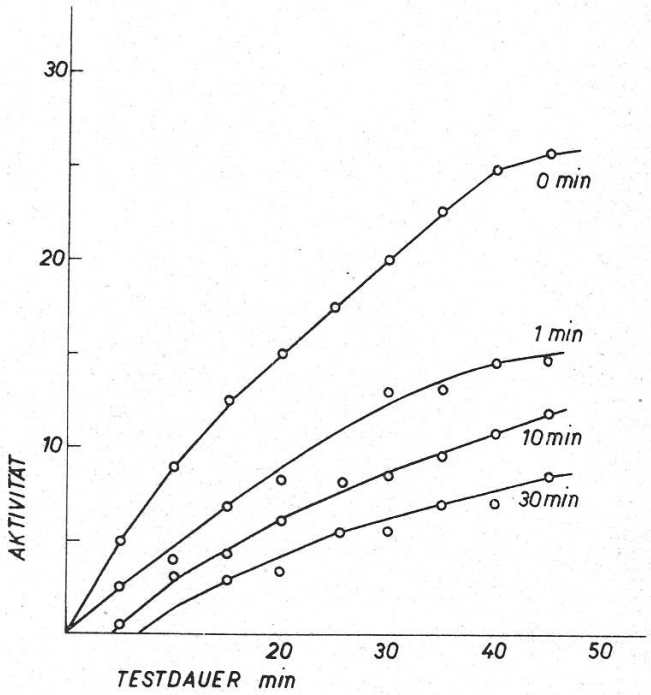
Trichoderma viride: Temperaturabhängigkeit der Aktivität gereinigter Cellulase auf CMC nach verschieden langer Testdauer
○——○ Viscositätsänderung nach verschiedenen Zeiten (V)
△——△ reduzierende Zucker nach 2 Tagen (R)

von Enzymen. Wenn für die optimale Reaktionstemperatur im allgemeinen Werte gefunden wurden, die für Enzyme üblich sind, erstaunen die Angaben über die extreme Hitzestabilität, sofern man annimmt, daß es sich auch hier um Eiweißkörper handle.

Sison, Schubert et Nord (1958) fanden, daß nach halbstündigem Erhitzen auf 80° C noch 40% der ursprünglichen Aktivität einer gereinigten Cellulaselösung von *Poria vaillantii* vorhanden ist. Norkrans (1957) untersuchte *Polyporus-annosus*-Cellulasen und fand nach 20minütigem Erhitzen auf 80° C nur noch 30% der ursprünglichen Aktivität, nach 20minütigem Kochen war die Enzymlösung aber immer noch etwas aktiv. Eine β-Glucosidase (Test gegen p-Nitrophenyl-β-Cellobiosid) war dagegen bei 80° C nach 20 Minuten schon völlig inaktiv. Ähnliche Ergebnisse, eine relativ thermostabile Cellulase (3 Minuten bei 100° C: 15% Restaktivität) und eine thermolabilere β-Glucosidase, hatten Kooiman et al. (1953) zur Trennung der beiden Enzyme verwendet.

Extreme Resultate stammen von Schäfer (1957) bei nicht gereinigten Enzympräparaten (Kulturlösung von *Aspergillus terreus*). Während die Enzyme in Lösung nach 3 Stunden Erhitzen bei 70° C inaktiviert waren, hatte das Enzym*pulver*[1] (die Lösung wurde über H_2SO_4 getrocknet) nach 3 Stunden Erhitzen auf 140° C noch ca. 20 % der ursprünglichen Aktivität. Eine Cellulaselösung von *Trichoderma koningii* wurde dagegen nach Toyana (1953) bei 55° C völlig inaktiviert[2].

Aus diesen sich z.T. widersprechenden Ergebnissen wird besonders deutlich, daß nur Präparate von sich entsprechendem Reinheitsgrad vergleichbar sind. Da es sich bei allen bisher gefundenen Enzymen um Proteine handelt, kann dies auch für Cellulase angenommen werden. Proteine in Lösung sind jedoch bei weitem nicht so hitzestabil. Die Cellulaseproteine müssen hier also in einem «geschützten» Zustand vorliegen, und das ist wohl wesentlich davon abhängig, mit welchen anderen Stoffen, eventuell auch anderen Proteinen, sie zusammen vorkommen bzw. «verunreinigt» sind.



Figur 9

Irpex lacteus: Hitzeresistenz gereinigter Cellulase, Aktivität $(t_0 — t_{10min})/t_0$. Die Enzymlösungen wurden 0–30 Minuten kochend gehalten und dann den Testlösungen zugefügt, deren Viscosität bestimmt wurde

Bei den Untersuchungen der Autorin wurden die gereinigten Enzymlösungen von *Irpex lacteus* und *Trichoderma viride* verschiedene Zeiten in

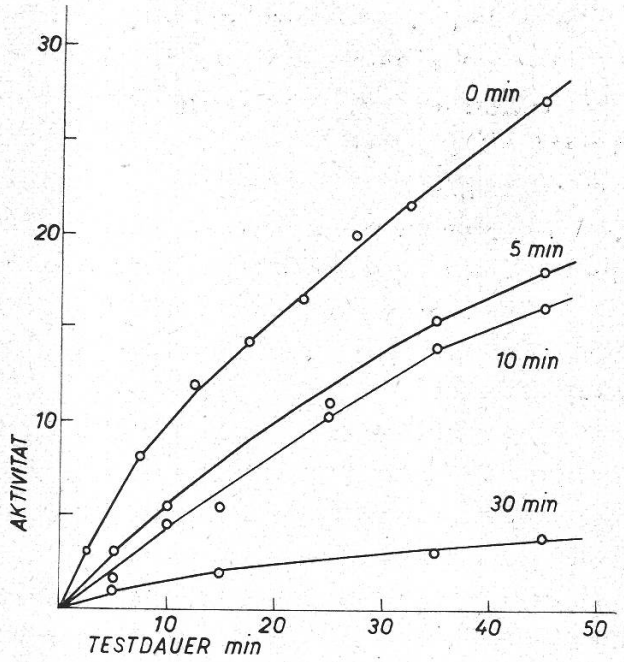
---

[1] Offenbar erhöht die scharfe Entwässerung die Thermostabilität, wie dies z.B. auch für Eiweiße scharf getrockneter Samen und Sporen gilt.

[2] Dauer der Behandlung unbekannt.

kochendem Wasser gehalten, dann auf 20° C abgekühlt und die Aktivität wie üblich viskosimetrisch gegen CMC gemessen. Im Gegensatz zu allen zitierten Ergebnissen (mit Ausnahme von Schäfer, 1957) konnten nach halbstündigem Kochen der Enzymlösung von *Irpex lacteus* immer noch 30% der Aktivität einer unbehandelten Lösung festgestellt werden (Figur 9).

Die Resultate bei *Trichoderma-viride*-Cellulaselösung sind etwas anders (Figur 10). Diese Lösung wird durch 10minütiges Kochen weniger inaktiviert als die *Irpex*-Cellulase (60% der Aktivität der Kontrolle gegenüber nur 46% bei *Irpex*). Nach 30minütigem Kochen ist die Aktivität bei *Trichoderma*-Cellulase jedoch auf 16% abgesunken, also gerade um 14% mehr als bei Irpex.



Figur 10

Trichoderma viride: Hitzeresistenz gereinigter Cellulase, Aktivität $(t_0 - t_{10min})/t_0$
(Behandlung der Lösungen siehe Figur 9)

Abbauprodukte

Man stellt sich im allgemeinen vor, daß die katalytische Wirkung der Enzyme auf bestimmte Stellen des Enzymmoleküls beschränkt ist. Solche aktive Stellen können während einer enzymatischen Reaktion z. T. von Abbauprodukten, sofern diese dem ursprünglichen Substrat ähnlich sind, besetzt werden und damit für die Katalysierung des Substratabbaus ausfallen. Eine Anhäufung von Abbauprodukten kann also einen Aktivitätsverlust des Enzyms zur Folge haben. Umgekehrt kann man auch schließen, daß, wenn eine Substanz von ähnlichem Aufbau wie das Substrat auf die katalysierte Reaktion hemmend wirkt, sie auch im Prozeß selbst auftritt.

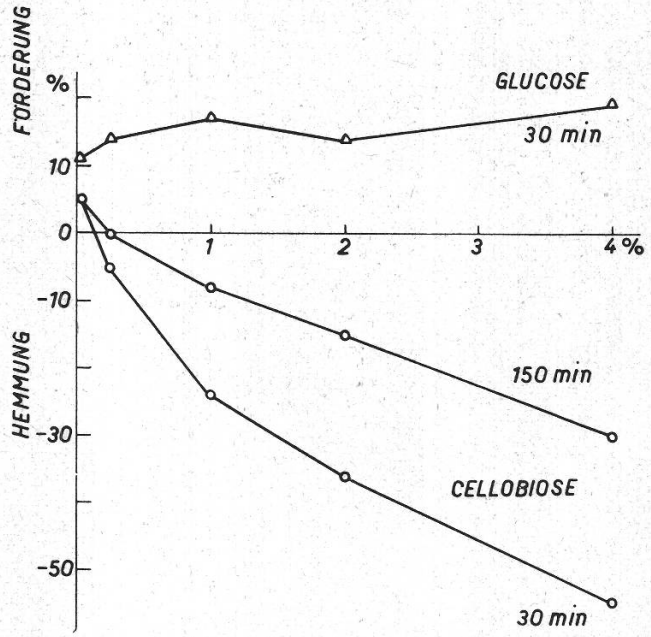
Im Falle des Celluloseabbaus ist es interessant, die mutmaßlichen Endprodukte des Abbaus, Cellobiose und Glucose, in dieser Hinsicht zu untersuchen. Einige Forscher (Reese, Norkrans, Kooiman u.a.) vertreten nämlich die Ansicht, daß eine oder mehrere Cellulasen die Cellulose bis hinab zur Cellobiose spalten, für deren Abbau jedoch eine besondere β-Glucosidase, Cellobiase, verantwortlich sei. Whitaker, Hash et King und Nisizawa nehmen dagegen an, daß eine oder mehrere Cellulasen für den vollständigen Abbau bis zur Glucose verantwortlich sind.

Dieses Problem ist schwierig abzuklären, da es ein von anderen Enzymen freies Cellulasepräparat voraussetzt. Versuche, bei denen zu einer Testlösung von CMC zusätzlich Glucose oder Cellobiose zugegeben werden, umgehen diese Schwierigkeit. Für die Veränderung der Viscosität von CMC sind sicher Cellulasen verantwortlich. Wird diese Veränderung von Glucose und Cellobiose nicht beeinflußt, so kann man annehmen, daß die bei dem Abbau entstehenden Cellobiose und Glucose durch die Wirkung eines anderen als des CMC spaltenden Enzyms entstanden sind. Allerdings könnte man sich auch vorstellen, daß, wenn ein Enzym die Fähigkeit hat, verschiedenartige Abbaureaktionen zu katalysieren (Spaltung von langen Ketten und Abspaltung kleinerer Einheiten vom Ende einer Kette), die Reaktionen, für die vielleicht verschiedene aktive Stellen zuständig sind, auch durch Glucose und Cellobiose verschieden beeinflußt werden. Es würde also in diesem Fall nicht die CMC-Spaltung, sondern nur das Auftreten von Glucose und Cellobiose gehemmt. Für solche differenzierte Untersuchungen sind jedoch wieder reine Enzyme (d.h. z.B. frei von Cellobiase) Voraussetzung. Es soll aber durch diese Überlegungen nur dargelegt werden, daß eine Hemmung sicher darauf hinweist, daß die zugesetzte Substanz auch beim Abbau auftritt. Wird keine Hemmung beobachtet, so heißt das noch nicht, daß diese Substanz nicht auftritt.

Reese, Gilligan und Norkrans (1952) haben über diesen Punkt bei Cellulasen mehrerer Organismen eingehende Untersuchungen gemacht. Sie fanden, daß eine steigende Zugabe von Cellobiose im allgemeinen den CMC-Abbau immer stärker hemmt, daß jedoch Glucosegaben eher stimulierend wirken. Die Stimulation nimmt bei steigender Konzentration jedoch ab. Norkrans (1950) stellte die hemmende Wirkung von Cellobiose auf den Abbau einer ungefällten Cellulose durch cellulolytische Enzyme von *Tricholoma nudum* schon bei einer Konzentration von 0,03 % fest. Im Gegensatz zu Reese et al. bewirkte eine Erhöhung der Cellobiosekonzentration über 0,03 % keine zusätzliche Hemmung des Abbaus.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Thomas (1956) bei gereinigter Cellulase von *Stachybotrys atra* und Schäfer (1957) bei Kulturlösungen von *Aspergillus terreus*. Beide konnten sowohl durch Glucose als auch durch Cellobiose keinen Einfluß auf den Abbau von methylierter Cellulose feststellen.

Eigene Untersuchungen mit cellulolytischen Enzymen von *Irpex lacteus* und *Trichoderma viride* (Figur 11) ergaben im wesentlichen gleiche



Figur 11

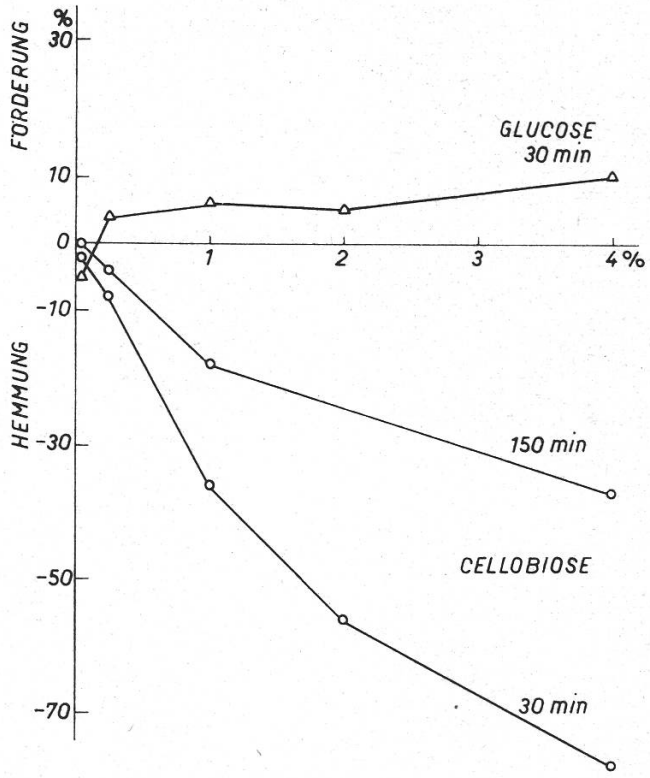
Irpex lacteus: Einfluß von Glucose und Cellobiose auf die Aktivität gereinigter Cellulase auf CMC nach verschiedenen Zeiten

△——△ Glucose ○——○ Cellobiose

Resultate wie die von Reese et al. (1952b). Schon eine Konzentration von 0,25% Cellobiose hemmt den CMC-Abbau durch *Irpex*-Cellulase. Im Gegensatz zu Norkrans hat aber eine 0,03%ige Cellobioselösung noch keinen Effekt. Eine Erhöhung der Cellobiosekonzentration wirkt immer stärker hemmend, jedoch nimmt die Hemmung auch bei 30 Minuten Testdauer nicht proportional zu. Die hemmende Wirkung von Cellobiose nimmt stark ab, wenn die Testdauer von 30 Minuten auf 150 Minuten erhöht wird. Es ist bekannt, daß bei jeder enzymatischen Reaktion der Abbau pro Zeiteinheit nur am Anfang konstant ist, bald jedoch stark abnimmt, was zum Teil durch die entstehenden Abbauprodukte erklärt wird. Nach 150 Minuten Testdauer ist bei der Kontrolle (Testlösung ohne zusätzliche Cellobiose) bereits der hemmende Einfluß der durch die enzymatische Reaktion entstandenen Abbauprodukte bemerkbar. Eine Erhöhung der Cellobiosemenge bei den Versuchslösungen hat daher bei 150 Minuten Testdauer einen relativ geringeren Effekt als bei 30 Minuten Testdauer.

Eine geringe Zugabe von Glucose hatte bei cellulolytischen Enzymen von *Irpex lacteus* eine leicht stimulierende Wirkung, die aber durch eine Erhöhung der Konzentration nicht mehr beeinflußt wurde.

Die Ergebnisse bei *Trichoderma viride* entsprechen denen bei *Irpex lacteus* und bestätigen die Untersuchungen von Reese et al. (1952b) im wesentlichen (Figur 12). Allerdings konnte bei einer Cellobiosekonzentration von 0,03% eine leichte Stimulation beobachtet werden. Glucose wirkt wiederum, unabhängig von der Konzentration, leicht fördernd.



Figur 12

Trichoderma viride: Einfluß von Glucose und Cellobiose auf die Aktivität gereinigter Cellulase auf CMC nach verschiedenen Zeiten
△——△ Glucose ○——○ Cellobiose

Damit darf als sicher angenommen werden, daß Cellobiose beim Abbau von CMC durch Enzyme von *Irpex* wie auch von *Trichoderma* auftritt; Glucose ist jedoch wahrscheinlich kein Abbauprodukt (siehe dazu S. 341).

Inhibitoren

Alle bisher gefundenen Enzyme haben einen Proteinanteil, der meistens SH-Gruppen, COOH-Gruppen und NH_2-Gruppen enthält. Alle Reagentien, die mit diesen Gruppen reagieren, hemmen die entsprechenden Enzyme. Auftreten und Ausmaß der Hemmung ist wesentlich vom *p*H der entsprechenden Lösung abhängig. Proteine und also auch Enzyme tragen in saurer Lösung positive Ladung und können daher mit negativ geladenen Ionen, z.B. Phosphorwolframsäure, reagieren. Hemmungen dieser Art sind meistens irreversibel. Oft kann auch eine Hemmung durch

leichte Oxydationsmittel hervorgerufen werden; leichte Reduktionsmittel können diese Hemmung meist wieder rückgängig machen.

Über die Wirkung von Inhibitoren auf Cellulasen existieren noch wenig Ergebnisse. Basu und Whitaker (1953) untersuchten viele Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Aktivität von *Myrothecium-verrucaria*-Cellulase. Sie fanden, daß sowohl Schwermetallionen als auch reduzierende und oxydierende Substanzen hemmend wirken. Auch durch spezifische SH-Reagentien, wie Jodessigsäure, wurde die Aktivität herabgesetzt. Auch Sison et al. (1958b) fanden, daß die Blockierung der SH-Gruppen von cellulolytischen Enzymen von *Poria vaillantii* deren Aktivität herabsetzt. Thomas (1956) hingegen konnte in seiner Enzymlösung von *Stachybotrys atra* weder die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein, Cystin und Methionin entdecken, noch wirkte Jodessigsäure auf die Aktivität der Enzyme hemmend.

Tabelle 7

Irpex lacteus und Trichoderma viride: Hemmung der cellulolytischen Aktivität des gereinigten Enzympräparates
Konzentration aller Substanzen: 10^{-3} M

Substanz	*Irpex lacteus*		*Trichoderma viride*	
	% Aktivität der Kontrolle		% Aktivität der Kontrolle	*t*
Cystin + Cystein	92	1,7	87	12,1[2]
KCN	66	8,3[1]	89	47,5[3]
Phosphorwolframsäure	68	7,8[1]	96	2,9
Trichloressigsäure	30	17,8[2]	64	59,8[3]

[1] P = 0,05 [2] P = 0,01 [3] P = 0,001

Die eigenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Zu der üblichen CMC-Lösung (*p*H 5,5) wurden die entsprechenden Inhibitoren gegeben und die Menge der reduzierenden Zucker dieser Lösungen nach 2 Tagen bestimmt. Eine Testlösung ohne Zusätze diente als Kontrolle.

Irpex-lacteus-Cellulase wird durch KCN, Phosphorwolframsäure und Trichloressigsäure signifikant gehemmt, und zwar durch Trichloressigsäure bei weitem am stärksten. Die gleichen Gifte beeinträchtigen auch die Aktivität der Cellulaselösung von *Trichoderma viride*, die Hemmung ist jedoch weniger stark. Das Oxydationsmittel Cystin hat in beiden Fällen keinen Einfluß, nach Zugabe von Cystein konnte bei *Trichoderma viride* ein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet werden. Cystin mit

Tabelle 8

Trichoderma viride: Aktivität gereinigter Cellulase gegenüber verschiedenen Substraten, nach verschiedenen Zeiten untersucht

C = Cellobiose G = Glucose $t = 30°C$ $pH = 5,5$

Die quantitativen Angaben sind Schätzungen, mit Ausnahme jener der letzten Kolonne

Substrat	2 Tage		14 Tage		19 Tage		25 Tage		32 Tage		44 Tage		60 Tage		Reduzierende Zucker nach 2 Tagen
	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	
Walseth-Cellulose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	0	0	0
Phosphorcellulose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0
Cellobiose[1]	+++	0	+++	+	+++	+	++	+	++	+++	+	+++	0	+++	0,029
SCD	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	++	0	++	0,152
CMC	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	?	0,344
Salicin	0	0	0	+	0	+	0	+	0	++++	0	++++	0	+++	0,041
ICD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Natürliche Cellulose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0
Alkalicellulose	0	0	0	0	0	+	0	?	0	+	0	+	0	+	0
Lösliche Stärke		0	+	+	0	0	0	+	0	+++	0	++	0	+	0,46

[1] Der Abbau dieses Substrates ist auf vorhandene Cellobiase zurückzuführen (s. S. 346).

Ascorbinsäure oder KCN hatten bei beiden Präparaten keine schädigende Wirkung.

Substratspezifität der Enzympräparate

Um Aufschluß über die Wirkungsbreite gereinigter Cellulaselösungen von *Irpex lacteus* und *Trichoderma viride* zu erhalten, wurden die Enzympräparate (für *Irpex lacteus* 4,6 mg Trockensubstanz pro 50 ml Testlösung, für *Trichoderma viride* 10 mg pro 50 ml Testlösung) zu einer Testlösung (s. S. 319) mit den entsprechenden Substraten gegeben. Nach 2 Tagen wurden die reduzierenden Gruppen nach Nelson (1944) gemessen und nach bestimmten Abständen Proben zur chromatographischen Untersuchung entnommen. Dadurch sollte die Art der Abbauprodukte und der Zeitpunkt ihres Auftretens ermittelt werden. Als Substrate wurden die selbsthergestellten Substanzen und einige käufliche Präparate verwendet.

Das Ergebnis ist für *Trichoderma viride* aus Tabelle 8 zu ersehen. Gereinigte Cellulase von *Trichoderma viride* hat keine Aktivität gegen ICD (s. S. 320) und Walseth-Cellulose. Gegenüber Alkalicellulose, natürlicher Cellulose und Phosphorcellulose ist die Aktivität so gering, daß nach 2 Tagen mit der Methode von Nelson keine reduzierenden Zucker gefunden werden konnten; erst nach 32 Tagen kann papierchromatographisch Glucose in kleinen Mengen nachgewiesen werden. Eigenartigerweise ist der reduzierende Wert abgebauter CMC-Lösung schon nach 2 Tagen relativ hoch. Glucose kann aber papierchromatographisch erst nach 25 Tagen eindeutig festgestellt werden. Daß in dem gereinigten Enzympräparat außer Enzymen, die 1,4-β-glykosidische Bindungen spalten können, auch solche sind, die 1,4-α-glykosidische und aryl-β-glykosidische Bindungen spalten, zeigt die Aktivität des Präparates gegenüber löslicher Stärke und Salicin[1]. Auch SCD, das aus niederen, löslichen Cellulosedextrinen (s. S. 320) besteht, wird schnell und stark abgebaut. Cellobiose wird von dem Präparat ebenfalls angegriffen, sie ist nach 60 Tagen völlig zu Glucose abgebaut. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, die schon auf Seite 340 geäußert wurde, daß für den Cellobioseabbau ein besonderes Enzym, Cellobiase, verantwortlich sei und daß die Cellulase der untersuchten Pilze, möglicherweise überhaupt alle Cellulasen, nur bis zur Cellobiose abbauen können.

Eine einfache Methode, um die Wirkung der Cellobiase auszuschalten, fanden Kooiman et al. (1953) für Präparate von *Myrothecium verrucaria*. Sie erhitzten die Enzymlösung und zerstörten dadurch die thermolabile Cellobiase. Als Abbauprodukt fanden sie dann nur noch Cellobiose.

---

[1] Kontrollösungen dieser Substrate ohne das Enzympräparat zeigten unter gleichen Bedingungen keinen Abbau.

Auch Sison et Schubert (1958a), stellten bei *Poria vaillantii* ähnliche Resultate fest.

In der vorliegenden Untersuchung wurden Enzymlösungen von *Irpex lacteus* und *Trichoderma viride* 5 Minuten gekocht. Die Kontrollösungen blieben unbehandelt. Die Testlösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Cellobiose	50 mg
(oder CMC	20 mg)
Enzymlösung[1]	1 ml
H_2O (Preventol-PN-gesättigt)	4 ml

Die Lösungen blieben bei 30° C 8 Tage im Dunkeln stehen und wurden dann papierchromatographisch untersucht.

Bei *Trichoderma viride* zeigte sich deutlich, daß das gekochte Enzym keine Cellobiaseaktivität mehr hat. Die Menge von Cellobiose, die aus CMC entstanden war, war zu gering, um chromatographisch nachgewiesen werden zu können. Im Enzympräparat von *Irpex lacteus* wurde keine Cellobiose gefunden; auch die *ungekochte* Enzymlösung baute Cellobiose nicht ab.

Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Resultaten anderer Versuche, wonach bei Zusatz eines gereinigten Cellulasepräparates von *Irpex lacteus* zu Cellobiose selbst nach 38 Tagen *keine* Glucose entstand. Ebenso konnte auch bei Einwirkung desselben Präparates auf die in Tabelle 8 angegebenen Substrate nur Cellobiose als Abbauprodukte nachgewiesen werden; die Aktivität des Präparates hat sich als gering erwiesen. Natürliche Cellulose und Phosphorcellulose wurden nicht abgebaut.

Versuche über die Natur des Enzymeiweißes

Eine analytische Untersuchung der Enzympräparate wäre weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen. Die Verfasserin hat sich darauf beschränkt, einige allgemeine Nachweisreaktionen mit dem gereinigten Enzympräparat von *Trichoderma viride* durchzuführen.

Das Enzympräparat ist vollkommen wasserlöslich, schäumt und läßt sich mit $(NH_4)_2SO_4$ aussalzen. Der Nitroprussidtest, auf SH-Gruppen spezifisch, war negativ. Das Enzym ist mit Aceton reversibel fällbar (s. S. 329). Mit Trichloressigsäure tritt eine deutliche Hemmung der Aktivität auf, ein Niederschlag konnte jedoch selbst bei hoher Konzentration der Säure nicht beobachtet werden. Die Ninhydrinreaktion war schwach positiv, dagegen fiel die Biuretreaktion auch bei hohen Enzymgaben ne-

[1] Für *Irpex lacteus* 116 mg Trockensubstanz pro 20 ml Lösung, für *Trichoderma viride* 112,4 mg pro 20 ml Lösung.

gativ aus. Der noch empfindlichere Nachweis mit Kupfer-Folin-Reagens (Lowry et al., 1951) wies jedoch auf das Vorhandensein längerer Peptidketten hin.

Es ist nicht möglich, sich aus diesen wenigen Ergebnissen ein Bild über den Aufbau des Enzymmoleküls zu machen. Es besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, daß die Peptidketten relativ kurz sind (Biuret und Trichloressigsäure negativ) oder daß das Eiweiß in einer «geschützten» Form vorliegt (extreme Hitzestabilität).

Diskussion

Am Anfang dieser Arbeit ist auf einige ungelöste Probleme der Cellulaseforschung hingewiesen worden. Es handelt sich hauptsächlich um die Frage, ob der Celluloseabbau durch ein oder mehrere Enzyme katalysiert wird und ob das oder die Enzyme bei verschiedenen Pilzen verschieden sind. Im Zusammenhang damit steht die Frage der Spezifität.

Eine exakte Beantwortung dieser Probleme setzt Trennung und vollständige Reinigung der Enzyme voraus. Obwohl in dieser Arbeit nur eine teilweise Reinigung und Anreicherung durchgeführt werden konnte, soll doch versucht werden, aus den Versuchsergebnissen Schlüsse für eine Beantwortung dieser Fragen zu ziehen.

Produzieren *Irpex lacteus* und *Trichoderma viride* eine oder mehrere Cellulasen? Für *eine* Cellulase pro Pilz spricht die extreme Hitzestabilität; jedoch könnten auch mehrere Cellulasen auf ähnliche Weise mit Abbauprodukten (Reinouts van Haga, 1958) oder anderen Stoffen so verbunden sein, daß das Protein teilweise vor Hitze geschützt wird. Die *p*H-Optimum-Kurven sind steil und haben nur einen Gipfel, was auf nur *ein* Enzym hinweist. Daß sich mehrere Enzyme in dieser Hinsicht so ähnlich verhalten, ist nicht wahrscheinlich. Diese *eine* Cellulase hätte allerdings eine sehr große Spezifitätsbreite (von natürlicher Cellulose bis zu löslichen Cellulosedextrinen).

Werden von verschiedenen Pilzen die gleichen Enzyme gebildet? Auch hier spricht mehr *für* die Annahme, daß die gleichen cellulolytischen Enzyme durch die verschiedenen Pilze gebildet werden:

1. Die spezifische Aktivität (d.h. Aktivität pro mg Protein) ist bei beiden Präparaten, die sich im Reinheitsgrad stark unterscheiden[1], ähnlich. Pro mg Protein werden vom *Irpex*-Präparat in 10 Minuten 30 mg CMC abgebaut, von *Trichoderma* pro mg Protein in der gleichen Zeit 41,3 mg;

[1] Bei *Irpex lacteus* ist im gefriergetrockneten Präparat der durch Acetonfällung gewonnenen Lösung nur 5 % Protein enthalten. Es ist nicht wahrscheinlich, daß ein großer Teil der restlichen 95 % aus prosthetischen Gruppen ohne Eiweißcharakter besteht. Das entsprechende *Trichoderma*-Präparat besteht dagegen zu 80 % aus Protein.

mit anderen Worten, im *Irpex*- und *Trichoderma*-Präparat ist der Gehalt des Proteins an Enzymeiweiß etwa der gleiche.

2. Bei beiden Pilzen endet die *cellulolytische* Aktivität der produzierten Enzyme bei *Cellobiose*. Beide Pilze produzieren extracellulär eine β-Glucosidase, die für den Abbau der Cellobiose verantwortlich ist. Die obere Grenze ihrer Spezifität konnte nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Resultaten verschiedener Autoren (z.B. Kooiman et al., 1953, Sison et Schubert, 1958a). Eine Cellulase mit Cellobiaseaktivität fanden Whitaker (1953) und Hash et King (1958), wobei hier nur Spuren von Glucose gefunden werden konnten, sowie Nisizawa et al. (1954), die jedoch Zweifel hegen, ob in ihrem Präparat nicht doch eine Verunreinigung durch eine Cellobiase vorliegt. Die Cellobiaseproduktion von *Irpex* ist wesentlich geringer als die von *Trichoderma*, wahrscheinlich bedingt durch eine selektive Kulturlösung. Die Cellobiase wird durch die Acetonfällung aus dem *Irpex*-Präparat vollständig entfernt.
3. Das optimale *p*H ist für beide Präparate gleich.
4. Beide Präparate sind extrem hitzestabil.
5. Bei beiden Präparaten erfolgt der Abbau langer Celluloseketten an nicht vorbestimmten Stellen (rascher Abfall der Viscosität von CMC und späteres Auftreten reduzierender Zucker).
6. Beide Pilze bilden Cellulasen nur adaptiv.

Gegen das Vorhandensein der gleichen Cellulasen in beiden Präparaten spricht deren verschiedene Spezifität. Es könnte aber sein, daß auch *Irpex* längere Celluloseketten abzubauen vermag, daß aber die Aktivität dieses Präparates geringer ist. Diese Aktivitätsverminderung könnte z.B. dadurch zustande kommen, daß durch die Aufarbeitung ein Teil der aktiven Zentren oxydiert wird.

Im Gegensatz zu den *p*H-Optima unterscheiden sich, bei längerer Testdauer, die Temperaturoptima beider Cellulasen.

Zusammenfassung

1. Die Bildung von extracellulären cellulolytischen Enzymen von *Irpex lacteus* und *Trichoderma viride* geht mit dem Mycelwachstum parallel. Sie nimmt mit steigender Temperatur zu und wird durch Schütteln der Versuchslösung erhöht.
2. Einerseits begünstigt das Schütteln die *Enzymbildung* durch diese Pilze, anderseits wirkt das Schütteln auf die Enzyme von *Irpex lacteus* inaktivierend. Dafür ist zum Teil die erhöhte Berührung mit

Sauerstoff verantwortlich. Bei *Trichoderma viride* konnte kein schädlicher Einfluß des Schüttelns beobachtet werden. Gedämpftes Tageslicht hatte bei beiden Pilzen keinen Einfluß auf die Enzymproduktion.

3. Cellulolytische Enzyme werden in beiden Fällen nur gebildet, wenn das entsprechende Substrat in der Kulturlösung des Pilzes vorliegt; die Cellulasen sind also adaptiv.

4. Es konnten durch Umfällungen mit Aceton Enzympräparate hergestellt werden, deren Gehalt an nichtenzymatischem Eiweiß gering ist. Das Präparat von *Irpex lacteus* war frei von Cellobiase, während das von *Trichoderma viride* dieses Enzym enthielt. Die Aktivität pro Proteinmenge ist bei *Irpex lacteus* geringer als bei *Trichoderma viride*.

5. Das *p*H-Optimum der Aktivität beträgt für beide Präparate *p*H 4,1.

6. Die cellulolytischen Enzyme beider Pilze besitzen eine erstaunlich hohe Thermostabilität. Nach halbstündigem Erhitzen auf 99° C hatte das *Irpex*-Präparat noch 30%, das *Trichoderma*-Präparat noch 16% der ursprünglichen Aktivität. Die Cellobiase des *Trichoderma*-Präparates wurde durch 5 Minuten dauerndes Erhitzen auf 99° C vollkommen zerstört.

7. Die optimale Reaktionstemperatur beider Enzympräparate liegt für 150 Minuten Testdauer bei 60° C. Bei *Irpex lacteus* fällt sie bei Erhöhung der Testdauer auf 580 Minuten auf 30° C, während sie bei *Trichoderma viride* nach 2 Tagen noch 40° C beträgt.

8. Cellobiose wirkt auf die cellulolytische Aktivität beider Präparate hemmend, Glucose dagegen fördernd.

9. KCN und Trichloressigsäure hemmen die Aktivität beider Cellulasepräparate; Phosphorwolframsäure wirkt nur auf das Präparat von *Irpex lacteus*, Cystein-Cystin nur auf das von *Trichoderma viride*.

10. Das *Irpex*-Präparat hat gegenüber den untersuchten Substraten mit Ausnahme von Carboxymethylcellulose eine sehr geringe, gegenüber Cellobiose keine Aktivität.

    Durch *Trichoderma*-Enzyme werden außer ICD und Walseth-Cellulose (s. S. 320) alle untersuchten Substrate zu Cellobiose abgebaut.

11. Einige allgemeine Reaktionen bestätigen die Eiweißnatur der untersuchten Enzyme; freie SH-Gruppen konnten nicht nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit wurde am *Botanischen Institut* der *Universität Basel* unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber ausgeführt; ich danke ihm herzlich für das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitstellung der notwendigen Hilfsmittel. Fräulein E. Rudin und ganz besonders Fräulein B. Baumgartner danke ich für ihre Mitarbeit und Herrn H. Müller für die Anfertigung technischer Hilfsmittel. Endlich bin ich Herrn cand. W. Hanstein für das Abschreiben des Manuskriptes und die Anfertigung der Figuren zu Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis

Basu S. N., Whitaker D. R. (1953). Inhibition and stimulation of cellulase of *Myrothecium verrucaria*. Arch. Biochem. and Biophys., **42**, 12–24.

— Pal P. N. (1956). An unfavourable effect of shaking on fungal cellulases. Nature, **178**, 312–313.

Frey-Wyssling A. (1936). Der Aufbau der pflanzlichen Zellwände. Protoplasma, **25**, 261–300.

Gilligan W., Reese E. T. (1954). Evidence for multiple components in microbial cellulases. Canad. J. Microbiol., **1**, 90–107.

Gralén N. (1944). Sedimentation and diffusion measurements on cellulose and cellulose-derivates. Diss. Uppsala.

Greathouse G. A. (1950). Microbiological degradation of cellulose. Textile Research J., **20**, 227–238.

Grimes R. M., Duncan C. W., Hoppert C. A. (1957). Multiplicity of cellulolytic enzymes of *Myrothecium verrucaria*. Arch. Biochem. and Biophys., **68**, 412–424.

Hash J. H., King K. W. (1954). Demonstration of an oligosaccharide intermediate in the enzymic hydrolysis of cellulose. Science, **120**, 1033–1035.

— — (1958). On the nature of the β-glucosidases of *Myrothecium verrucaria*. J. Biol. Chem., **232**, (1), 381–393.

Husemann R. E., Lötterle R. (1950). Über den fermentativen Abbau von Polysaccharide. I. Der heterogene Abbau von Cellulose. Makromol. Chemie, **4**, 278–288.

van Iterson jr. G. (1903). De aantasting van cellulose door aerobe micro-organismen. Verslag Wis- en Natuurkund. Afd. K. Akad. van Wetensch. te Amsterdam, **11**, 807–825.

Jermyn M. A. (1952a). Fungal cellulases. I. General properties of unpurified enzyme preparations from *Aspergillus oryzae*. Austral. J. Sci. Research, B, **5**, 409–432.

— (1952b). Fungal cellulases. II. The complexity of enzymes from *Aspergillus oryzae*, that split β-glucosid linkages, and their partial separation. Austral. J. Sci. Research, series B, Biological Sciences, **5**, 433–443.

— (1953). Fungal cellulases. III. *Stachybotrys atra:* Growth and enzyme production on non-cellulosic substrates. Austral. J. Biol. Sci., **6**, 48–69.

Jørgensen L. (1950). Studies on the partial hydrolysis of cellulose. Trykt Hos Emil Moesture, Oslo (1950).

Kooiman P. (1957). II. Some properties of cellulase of *Myrothecium verrucaria* and some other fungi. Enzymologia, **18**, 371–384.

— Roelofsen P. A., Sweeris S. (1953). Some properties of cellulase of *Myrothecium verrucaria*. Enzymologia, **16**, 237–246.

Levinson H. S., Reese E. T. (1950). Enzymatic hydrolysis of soluble cellulose derivatives as measured by changes in viscosity. J. Gen. Physiol., **33**, 601–628.

Lowry O., Rosenbrough N., Lewis Farr A., Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265–275.

Miller G. L., Blum R. (1956). Resolution of fungal cellulase by zone electrophoresis. J. Biol. Chem., **218**, 131–137.

Nelson N. (1944). A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., **153**, 375–380.

Nisizawa K. (1955). Cellulose-splitting enzymes. V. Purification of *Irpex*-Cellulase and its action upon p-nitrophenyl-β-cellobioside. J. Biochem. Tokyo, **42** (6), 825–835.

— Tanaka H., Ichikawa N. (1954). Cellulose-splitting enzymes. IV. Cellulaseproduction of *Irpex lacteus* in several culture media of different composition. Res. Repts. Fac. Text. and Sericult. Shinshu University, **4**, 56–59. a/ Chem. Abstr. **49**[4], 14051 (1955)

Norkrans B. (1950). Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. Symb. Bot. Upsaliensis, **11**, 1–126.
— (1957). Studies of β-glucoside and cellulose splitting enzymes from *Polyporus annosus* Fr. Phys. Plant., **10**, 198–214.
Reese E. T. (1956). A microbiological process report. Enzymatic hydrolysis of cellulose. Applied Microbiology, **4**, 39–45.
— Levinson H. S. (1952a). A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. Phys. Plant., **5**, 345–366.
— Gilligan W., Norkrans, B. (1952b). Effect of cellobiose on the enzymatic hydrolysis of cellulose and its derivates. Phys. Plant., **5**, 379–390.
— Siu R. G. H., Levinson H. S. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolys is J. Bact., **59**, 485–497.
Reinouts van Haga P. (1958). Complex forms of cellulase. Nature, **182**, (4644) 1232.
Saunders P. R., Siu R. G. H., Genest R. N. (1948). A cellulolytic Enzyme preparation from *Myrothecium verrucaria*. J. Biol. Chem., **174**, 697–703.
Schäfer A. (1957). Über Bildung und Wirkung eines cellulosespaltenden Ferments aus Schimmelpilzen. Ber. d. Schweiz. Bot. Gesellschaft, **67**, 218–270 (Diss. Basel).
Sison jr. B. C., Schubert W.J. (1958a). On the mechanism of enzyme action. LXVIII. The cellobiase component of the cellulolytic enzyme system of *Poria vaillantii*. Arch. Biochem. and Biophys., **78**, 563–572.
— — Nord F. F. (1958b). On the mechanism of enzyme action. LXV. A cellulolytic enzyme from the mold *Poria vaillantii*. Arch. Biochem. and Biophys., **75**, 260–272.
Staudinger H., Feuerstein K. (1936). Über hochpolymere Verbindungen. 147. Mitteilung über den Polymerisationsgrad natürlicher und technischer Cellulosen. Liebigs Annalen der Chemie, **526**, 72–102.
Thomas R. (1956). Fungal cellulases VII. *Stachybotrys atra:* Production and properties of the cellulolytic enzyme. Austral. J. Biol. Sci., **9**, 159–183.
Toyana N. (1953). Cellulose decomposition by *Trichoderma koningii* II. J. Ferment. Technol. (Jap.), **31**, 315–320, a/Chem. Abstr. 48^2 (1954), 6114^h.
— (1954). Cellulose decomposition by *Trichoderma koningii* III. J. Ferment. Technol. (Jap.), **32**, 300–307, a/Chem. Abstr. 49^1 (1955), 1866.
Walseth C. S. (1952). Occurrence of cellulases in the enzyme preparations from microorganisms. Tappi, **35**, 228–233.
Whitaker D. R. (1953). Purification of *Myrothecium verrucaria* cellulase. Arch. Biochem. and Biophys., **43**, 253–268.
— (1952). An effect of proteins and proteoses on the cellulase of *Myrothecium verrucaria*. Science, **116**, 90–92.
— (1954). Hydrolysis of a series of β-1.4-oligoglucosides by *Myrothecium verrucaria* cellulase. Arch. Biochem. and Biophys., **53**, 439–449.
— (1956). The steric factor in the hydrolysis of β-1.4-oligoglucosides by *Myrothecium* cellulase. Canad. J. Biochem., **34**, 102–115.
— Colvin J. R., Cook W.H. (1954). The molecular weight and shape of *Myrothecium verrucaria* cellulase. Arch. Biochem. and Biophys., **49**, 257–622.