

BIOTECHNOLOGIE IN ÖSTERREICH

2. Arbeitstagung

28.-30. Mai 1980

Institut für Biotechnologie,
Mikrobiologie
und Abfalltechnologie der
Technischen Universität Graz
A-8010 Graz, Schlögelgasse 9.

FERMENTATIVER ABBAU VON STROH UND VERWANDTEN SUBSTRATEN

P.J.Stadler[§], J.Marihart⁺ und M.Röhr[§]

Kurzfassung:

Es wurden Fermentationen mit *Trichoderma* sp. auf Weizenstroh als Fermentationssubstrat durchgeführt. Die in der Abluft gemessene volumetrische CO₂-Abgaberate wurde dazu verwendet, um über den Fermentationsverlauf Rückschlüsse zu gewinnen. Eine Supplementierung des Mediums mit Glukose erwies sich als wenig vorteilhaft, da dadurch die Cellulasebildung reprimiert wurde und eine verzögerte und schlechtere Verwertung des Substrates Stroh erfolgte. Kinetische Untersuchungen des veratmeten Substanz zeigen in den ersten 50-60 h der Fermentation ein Wachstum nach dem Drittwurzelmodell, während für den Hauptverlauf des Prozesses keine einheitliche kinetische Gesetzmäßigkeit erkennbar ist.

1. Einleitung

Die Bildung von cellulolytischen Enzymen durch ausgewählte Stämme von *Trichoderma* sp. gilt in der Literatur als Paradebeispiel für die Produktion von extrazellulären Enzymen. Vom technologischen Standpunkt aus betrachtet ist die Gewinnung eines extrazellulären zellfreien Enzyms immer im Vordergrund der Betrachtung gestanden, da nur solche Enzyme wirtschaftlich in großem Umfang produziert werden können. Bei dieser Betrachtungsweise kommen physiologisch-biochemische Aspekte nicht zur Geltung. Daß die technologisch interessanten Vorgänge beim Abbau der Cellulose durch zellfreie Enzyme nicht immer vorbehaltlos auf den biologischen Abbau des Substrates durch Mikroorganismen übertragen werden können, soll diese Arbeit veranschaulichen.

Das bei den Fermentationen hergestellte Enzym sollte zum Abbau für Abfälle aus der Kartoffelstärkeindustrie verwendet werden. Als industrielles Substrat wurde Weizenstroh gewählt, da seine Faserzusammensetzung der

§ Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden einer Dissertation von P.J.Stadler entnommen, durchgeführt am Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie, TU Wien. Diese Arbeit wurde von der österreichischen Agrarindustrie unterstützt.

+ Institut für Biochemische Technologie und Mikrobiologie, TU Wien. + österreichische Agrarindustrie, Gmünd.

Kartoffelpülpe weitgehend entspricht und bei der direkten Verwendung Kartoffelpülpe als Fermentationssubstrat durch den hohen Stärkeanteil eine Induktion von Amylasen zu erwarten gewesen wäre.

Material und Methodik

Bei diesen Fermentationen verwendeten Stämme waren: *Trichoderma koningii*, aus einer Jute abbauenden Mikroorganismenpopulation, sowie *Trichoderma pseudokoningii*, aus einer Bodenprobe aus den ecuadorianischen Regenwald isoliert. Die Stämme wurden regelmäßig auf Malzagarplatten überimpft und bei -20 C im sporulierten Zustand aufbewahrt.

Als Fermentationssubstrat wurde Weizenstroh verwendet. Dieses wurde bis eine mittlere Länge der Strohteilchen von 1,5 mm zerkleinert und Natronlauge vorbehandelt. Die Vorbehandlung erfolgte durch Suspension des Strohs in der zehnfachen Menge einprozentiger Natronlauge unter mehrmaligen Umrühren 48 Stunden lang bei Zimmertemperatur. Darauf wurde H_2SO_4 neutralisiert und die dunkelbraune Lösung durch Filtration von der Festsubstanz getrennt. Zweimaliges Waschen mit Leitungswasser und Abpressen bis zu einer Trockensubstanz von ca. 18 % beendeten Vorbehandlung. Die Aufbewahrung des Strohs erfolgte in eingefrorenem Zustand.

Die verwendeten Kulturmedien zeigt Tabelle 1.

3,0 g $(NH_4)_2SO_4$ 2,0 g

KH_2PO_4 0,3 g

Harnstoff 0,3 g

$CaCl_2$ 0,3 g $MgSO_4$ 1,0

g Hefeextrakt 5,0 mg

$FeSO_4$ 1,3 mg $ZnSO_4$ 2,0

mg $CoCl_2$ 1,6 mg $MnSO_4$

20 g Agar Agar + 1) 20 g Glukose

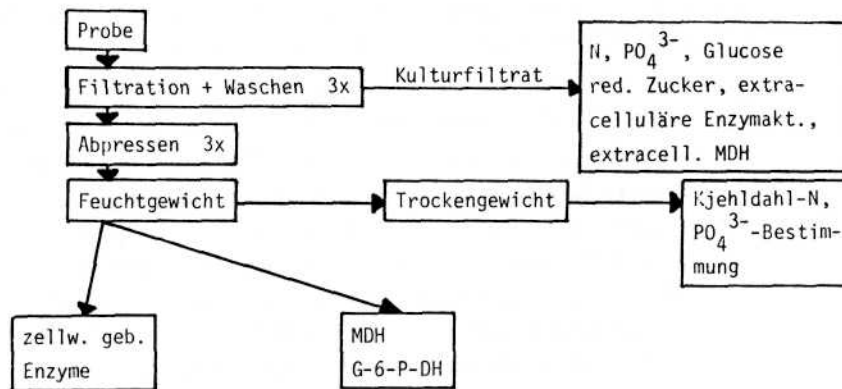
2) 20 g Stroh

3) 20 g Zellulose

2,5 g Glukose + 20 g Stroh vorbehandelt 20 g

Stroh vorbehandelt wurden in 1 l Leitungswasser gelöst.

Fig. 1 Probenanalyse



Die gezogenen Proben wurden nach Fig. 1 aufgearbeitet.

Die Bestimmung von Glukose erfolgte enzymatisch nach Bergmeyer (1962), reduzierende Zucker wurden nach der Dinitrosalizylsäuremethode nach Miller (1958) bestimmt.

Der Gehalt von NH_4^+ wurde mit der automatischen AnalysensträÙe (John, 1978) mit der Farbreaktion von Reardon et al. (1966) erfaÙt.

PO_4^{3-} wurde über die automatische Analyse (John, 1978) mit der Farbreaktion von Ames (1966) analysiert.

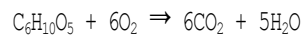
Protein wurde in der Festsubstanz nach der Methode von Kjeldahl bestimmt.

Die Bestimmung der gelösten Trockensubstanz erfolgte durch Eindampfen von mindestens 20 ml Kulturfiltrat, wonach der feste Rückstand ausgewogen wurde.

Die feste Trockensubstanz konnte nicht direkt bestimmt werden, da die Fermentation ziemlich inhomogen war. Deshalb mußte die feste Trockensubstanz rechnerisch ermittelt werden. Dies erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Gelbste TS} + \text{Summe d.veratmeten Substanz} + \text{feste TS} = \text{konst.}$$

Dieser Massenbilanz liegt folgende Gleichung zugrunde:



Gemessen wurde in diesem Fall das abgegebene CO_2 . Die dem CO_2 äquivalente Menge an $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ wurde dabei vollständig in CO_2 und H_2O übergeführt und

somit die feste TS um diese Menge verringert. Aus den kontinuierlich aufgezeichneten Meßwerten des CO₂-Gehaltes in der Abluft (bestimmt mit Siemens Ultramat 1) wurden die Mengen (in µmol/lmin) des ausgeschiedenen CO₂ berechnet. Zur Auswertung wurde über die Mittelsummen das Integral berechnet und diese veratmete Substanz direkt, logarithmisch und nach dem Drittwurzelgesetz aufgetragen.

Die Bestimmung der Filterpapieraktivität (FPA) wurde nach Mandels (1976) durchgeführt. Nach Bestimmung geeigneter Enzym- und Substratkonzentrationen wurde die Methodik dieser Filterpapieraktivitätsbestimmung auch auf die Aktivität gegenüber anderen Substraten wie Lichenan (LI), Naßpülpe (NP), Trockenpülpe (TP), Cellulose aus Pulpe (Cell), Stroh nativ (STn), Stroh vorbehandelt (STv) und Stärke (STä) angewandt. Die eingesetzten Enzym- bzw. Substratmengen gibt Tab. 2 wieder.

| | | | | | | | | |
|-------------------|----|------|------|------|------|------|-----|------|
| Substrat | FP | LI | NP | TP | STv | STn | STä | Cell |
| mg | 50 | 20 | 330 | 50 | 50 | 50 | 50 | 20 |
| ml Ez.Lag. | 0. | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.5 | 0.0 |
| +H ₂ O | 0 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0 | 0.4 |
| +ml | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Zellwandgebundene Aktivität konnte auf gleichem Weg bestimmt werden, ohne Zusatz von Filterpapier, mit 250 mg Feuchtsubstanz aus der Fermentation, d.h. eine Mischung von Biomasse und Substrat.

Die Bestimmung der intrazellulären Enzyme erfolgte durch möglichst rasches Abfiltrieren der Feuchtsubstanz, die zweimal mit Leitungswasser gewaschen und mit Filterpapier abgepreßt wurde. Ein geeignetes aliquotes Myzel-Strohgemisch wurde im Verhältnis 1:10 im Extraktionspuffer suspendiert und unter guter Kühlung (0 - 5°C) im Homogenisator nach Potter-Elvehjem aufgeschlossen (Galbraight und Smith, 1969). Das Homogenat wurde in der Kühl Zentrifuge bei 600 Upm 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet.

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde nach der Methode von Kornberg und Horecker (1955) modifiziert nach Waygold und Rohringer (1964) bestimmt. Als Aufschlußpuffer wurde Glycyl-Glycin pH 7,0 verwendet (Lakshiminarayana et al., 1969).

Malat-Dehydrogenase wurde nach Ochoa (1955) bestimmt. Der dazu verwendete 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 enthielt 1 mM Edta sowie 1 mM Dithiothreitol (Kitto et al., 1967).

Die Bestimmung einer extrazellulären Malat-Dehydrogenase erfolgte unter direkter Verwendung des Kulturfiltrates.

Die Zusammensetzung der Bestimmungsansätze ist aus Fig. 5 zu entnehmen.

3. Resultate und Interpretationen

Bei der ersten Fermentation, die hier behandelt werden soll, wurden 2,5 g Glukose zu den 20 g Stroh/l zugesetzt. Es sollte dabei untersucht werden, wie sich die Beschleunigung eines Primärwachstums auf Glukose auf die Wachstumsgeschwindigkeit auf dem cellulosehaltigen Substrat und auf die Fermentationsdauer und die Enzymproduktion auswirken würde.

Fig. 2 zeigt die volumetrische CO_2 -Abgaberate, den Verlauf des pH-Wertes und die NH_4^+ - Konzentration im Kulturmedium

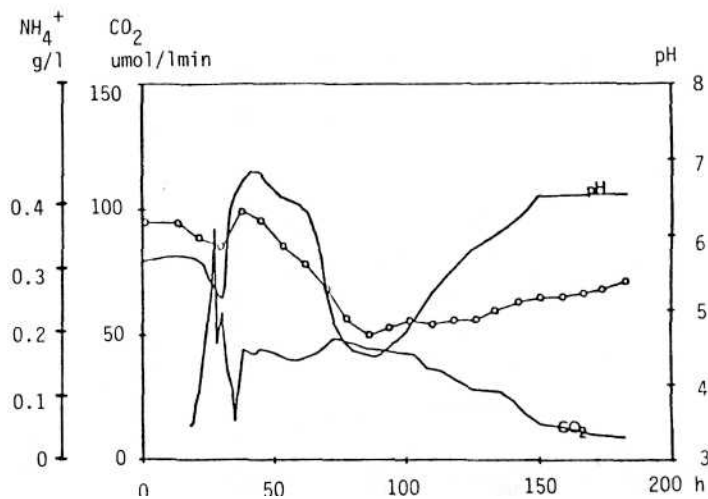


Fig. 2: pH, NH_4^+ im Kulturmedium und CO_2 -Output von Fermentation 1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer.

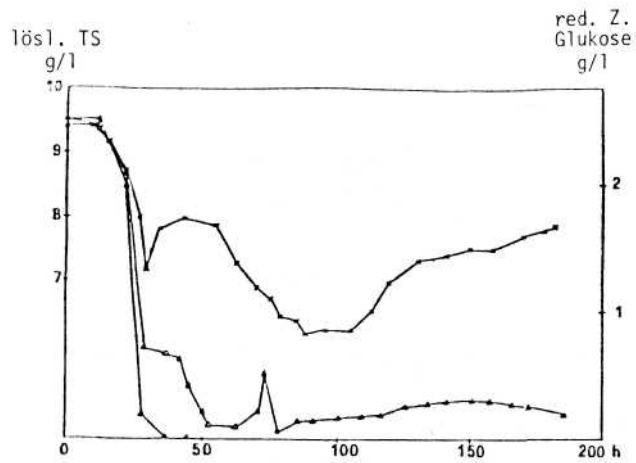


Fig. 3: Gelöste Trockensubstanz, Glukose und reduzierende Zucker im Kulturmedium von Fermentation 1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer.
x gelöste TS; A red. Zucker; ▲ Glukose

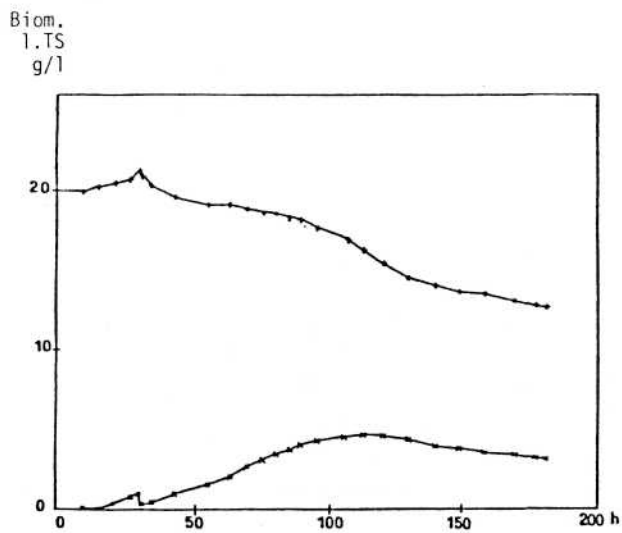


Fig. 4: Feste Trockensubstanz und Biomasse bei Fermentation 1 in Abhängigkeit von der Kulturdauer.
+ feste Trockensubstanz; x Biomasse

In Fig. 3 läßt sich der Verlauf der Konzentration von Glukose reduzierenden Zuckern und der gelösten Trockensubstanz erkennen.

Fig. 4 zeigt Biomasse und feste Trockensubstanz im Verlaufe der Fermentation.

Um eventuell eine Veränderung des Verhältnisses zwischen Katabolismus und Anabolismus im Laufe der Fermentation festzustellen, wurden die Aktivitäten zweier Schlüsselenzyme, Malat-Dehydrogenase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, im Myzel untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigt Fig. 5.

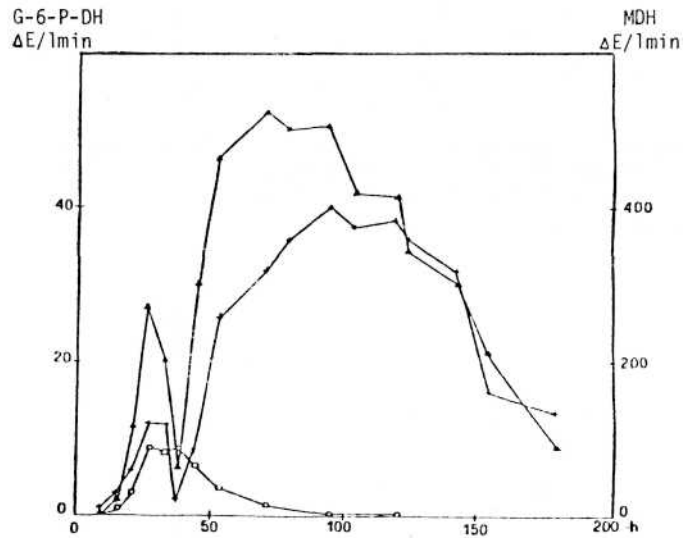


Fig. 5: Vergleich der Aktivitäten von Malatdehydrogenase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in der Festsubstanz und von MDH im Kulturfiltrat in der Abhängigkeit von der Kulturdauer.

MDH intracellulär; o MDH extracellulär; + Glukose-6-P-DH

Der Bestimmungsansatz für MDH enthielt in 3ml: 350μmol Phosphatpuffer pH 7,5, 0,2/μmol NADH und 0,8 μmol Oxalacetat (neutralisiert). Für G-6-P-DH in 3 ml: 200 μmol Glycyl-Glycinpuffer pH 7,4, 20 μmol MgCl₂, 1/μmol NADP und 10 μmol G-6-P.

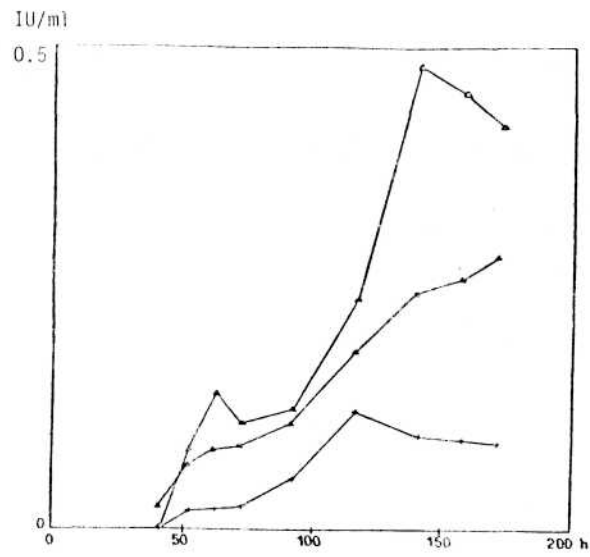


Fig. 6: Vergleich der Enzymaktivitäten des Kulturfiltrates von Fermentation 1 gegenüber Cellulose (aus Kartoffelpülpe), Lichenan und Filterpapier in der Abhängigkeit von der Kulturdauer.
+ Cellulose; A Filterpapier; ▲ Lichenan

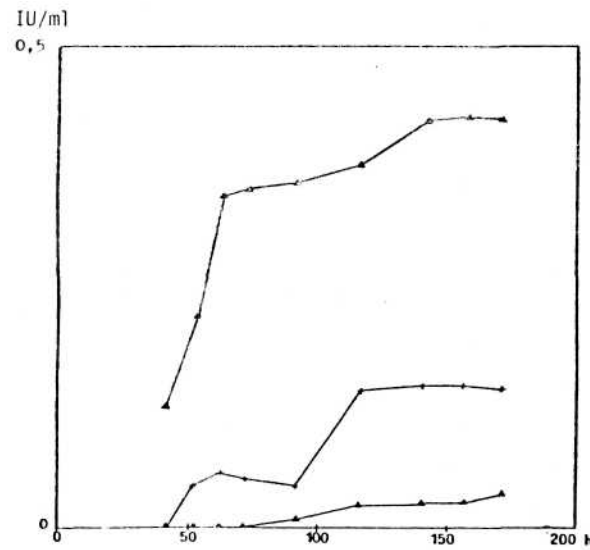


Fig. 7: Vergleich der Enzymaktivitäten des Kulturfiltrates von Fermentation 1 gegenüber Trockenpülpe, Stroh nativ und Stroh vorbehandelt.
A Stroh vorbehandelt; + Trockenpülpe; ▲ Stroh nativ

Fig. 6 und 7 zeigen, daß das Kulturfiltrat gegenüber dem Großteil der verwendeten Substrate einen ähnlichen Aktivitätsverlauf aufwies. Die Aktivität gegenüber vorbehandeltem Stroh setzte bereits vor einer Fermentationsdauer von 40 Stunden ein. Unbehandeltes Stroh, das an schwersten zugängliche Substrat, wurde vom Kulturfiltrat erst nach 90 Stunden abgebaut. Lichenan, Trockenpülpe, Filterpapier und Pulpe Cellulose wurden vom Zeitpunkt 50 Stunden an abgebaut. Diese Aktivitäten erreichten nach 70 Stunden ein vorläufiges Maximum, die nächsten Aktivitäten wurden bis 150 Stunden, erreicht (FPA = 0,28 IU/ml).

Diese Fermentation läßt sich am besten durch eine Einteilung in **fünf** Phasen charakterisieren. Nach einer anfänglichen lag-Phase (Phase I) von 10 Stunden wurde die vorhandene Glukose aufgenommen (Phase II). der CO₂-Output erreichte nach 27 Stunden seinen Höhepunkt, nachdem 25,5 % der vorhandenen Glukose veratmet waren. Der Abfall der Atmung war auf eine Verringerung der Glukosekonzentration in Lösung zurückzuführen. pH, NH₄ und gelöste Trockensubstanz zeigten einen ähnlichen Verlauf. Solange noch Glukose vorhanden war, wurde parallel dazu NH₄ aus dem Medium aufgenommen, der pH fiel. Die Biomasse nahm bis zum Zeitpunkte 30 Stunden zu, mit ihr auch die feste Trockensubstanz. Die intrazellulären Enzymaktivitäten von MDH und Glukose-6-P-DH erreichten ihr erstes Maximum nach 26 Stunden und gingen so mit der Atmung konform. In dieser Phase ließen sich noch keine extrazellulären Hydrolasen feststellen.

Kurz nach der völligen Aufnahme der Glukose setzte zum Zeitpunkt 30 Stunden die nächste Phase (III) ein. Zu Beginn sank die Atmung ab und erreichte nach 35 Stunden ein Minimum. Gleichzeitig kam es zu einer teilweisen Autolyse des auf der Glukose gebildeten Myzels, wie sich nicht nur mikroskopisch beobachten, sondern auch mit einem Ausscheiden von reduzierenden Zuckern, einem Anstieg der gelösten Trockensubstanz um 0,8 g/l und einer Ausscheidung von NH₄ (damit verbunden ein Ansteigen des pH) nachweisen ließ. Die intrazellulären Aktivitäten nahmen rasch ab. Ende und Höhepunkt dieser Phase wurden nach 42 Stunden erreicht, überlappend damit, ausgelöst durch das Ende der Glukoserepression, folgte nun die Phase der Strohverwertung (IV). Die Atmung erreichte ihr erstes Maximum auf dem Substrat Stroh nach 38 Stunden, NH₄⁺ wurde wieder aufgenommen, die Biomasse nahm

erneut zu, die feste Trockensubstanz begann abzunehmen. Ab 63 Stunden wurde der Ammoniakstickstoff in verstärktem Maß aufgenommen, was mit einem starken Sinken der pH von 6,4 auf 4,4 verbunden war. In dieser Phase begann auch die Ausscheidung von Hydrolasen.

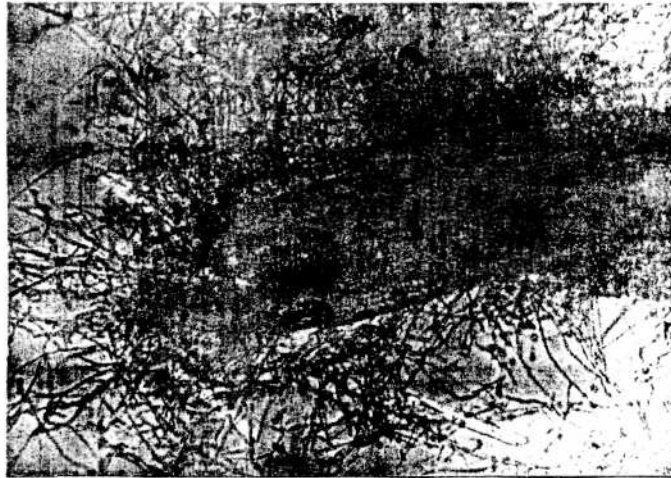


Fig. 8

Nach 83 Stunden nahm die lange Zeit konstant gebliebene Atmung wieder ab, nach 87 Stunden begann die letzte Phase (V). Es handelte sich hier ebenfalls um eine Autolyse. Der pH stieg an, NH_4^+ wurde wieder ausgeschieden, die Biomasse nahm ab, ebenso die feste Trockensubstanz, die gelöste Trockensubstanz dagegen nahm zu. Intrazelluläre MDH und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase nahmen ebenfalls ab. In dieser Phase wurden die extrazellulären Hydrolasen in verstärktem Maß ausgeschieden. Das Ende der Exkretion dürfte mit 150 Stunden erreicht worden sein, ein Zeitpunkt, zu dem auch kein weiteres Ansteigen des pH mehr zu beobachten war.

Mikroskopische Beobachtungen unterstützen die obigen Phaseneinteilungen. In Phase II ließ sich die Bildung von filamentösen Myzelfetzen beobachten, die Strohteile waren noch unbewachsen. In Phase III ließ sich dann ein teilweiser Bewuchs der Strohteile erkennen. Fig. 8 zeigt ein sogenanntes Strohpellet (Phase IV). Die ursprüngliche Strohschubstanz ist fast völlig durch Biomasse ersetzt, Stroh dürfte nur mehr in Spuren vorhanden sein. In der Phase V kam es zur Auflösung dieser pellets.

Die Vorgabe von Glukose bewirkte somit nur eine Verzögerung des eigentlichen Wachstums, letztlich eine schlechtere Strohverwertung und geringere Cellulaseproduktion. Die folgende Fermentation wurde daher ohne Glukosezusatz durchgeführt. Diese Fermentation wurde auf pH 3,6 stabilisiert. Figur 9 zeigt den CO₂-Output und den pH-Verlauf dieser Fermentation. Nach einer anfänglichen lag-Phase, die sowohl in Abluft als auch pH-Verlauf ersichtlich war, setzte -otzts das eigentliche Wachstum, erkenntlich an einem starken Anstieg des CO₂-Outputs ein. Der pH begann zunächst leicht, später stärker zu fallen. Die kurze Zwischenphase war auch in der Abluft ersichtlich. Nach Erreichen eines pH-Wertes von 3,5 setzte die pH-Statisierung ein, die von 50 bis 82 Stunden andauerte. Nach 82 Stunden begann der pH stark anzusteigen. Schon lange vorher hatte die Atmungsaktivität stark abgenommen. Fig. 10 zeigt den Verlauf der Filterpapieraktivitäten bzw. einer zellwandgebundenen Aktivität. Man sieht, daß zum Zeitpunkt des stärksten Wachstums auf dem Stroh zwischen 40 und 70 Stunden diese zellwandgebundene Aktivität ein Maximum erreicht, wogegen die extrazelluläre Cellulaseaktivität erst in der Phase der anfänglichen Ausscheidung begriffen ist. Nach 50 Stunden liegt erst ein geringer Bruchteil, nach 82 Stunden zwei Drittel des nach 130 Stunden erreichten Maximums vor. (- 0.45 IU/ml).

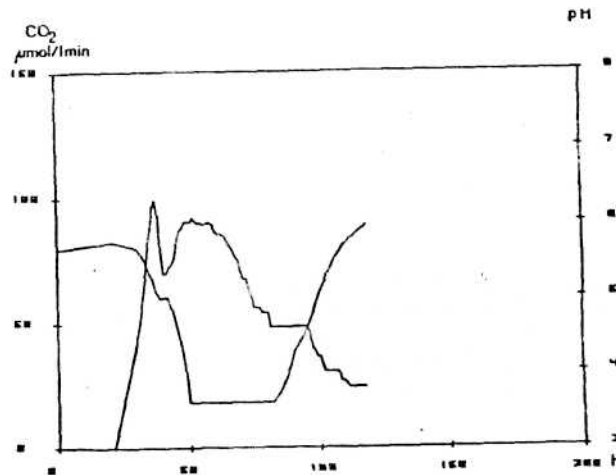


Fig. 9 : pH und CO₂-Output von Fermentation 2 in Abhängigkeit von der Kulturdauer.

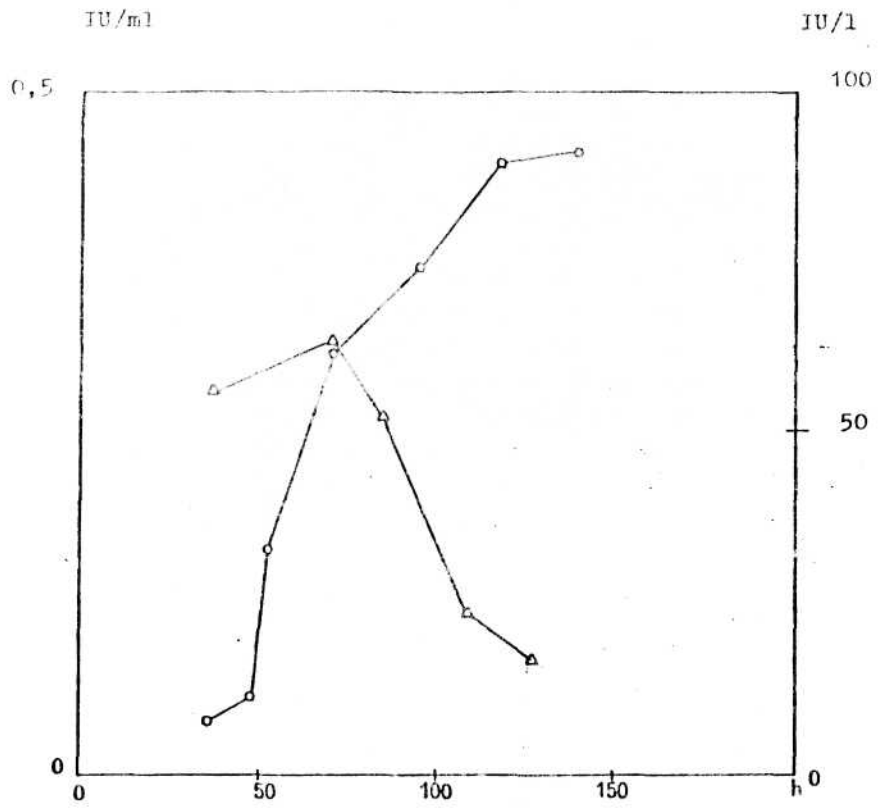


Fig. 10: Extrazelluläre Filterpapieraktivität und zellwandgebundene Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer von Fermentation A zellwandgebundene Aktivität o FPA im Kulturfiltrat

Um nun eine, wenn möglich quantifizierbare Vergleichsbasis für selbst-durchgeführte Fermentationen mit solchen aus der Literatur zu gewinnen, wurde untersucht, ob das Wachstum auf den verschiedenen Substraten Cellulose, Stroh oder Glukose einer bestimmten Wachstumskinetik gehorcht. Zu diesem Zweck wurde das Integral der veratmeten Substanz jeweils direkt, logarithmisch und nach dem Drittwurzelgesetz aufgetragen. Zu Vergleichszwecken wurde eine Fermentation des Natick-Institutes, es handelt sich dabei um Run Nr. 27 von Nystrom und Andren (1976), herangezogen, die gegen Ende der Fermentationsdauer eine FPA des Kulturfiltrates von 3,2 IU/ml besaß; das ist also um den Faktor 7 mehr Enzymaktivität als bei den zuvor angeführten Fermentationen. Diese 7-fach größere Enzymkonzentration ließe erwarten, daß trotz der verschiedenen Substrate Cellulose und Stroh beträchtliche Unterschiede in den Wachstums- und Veratmungsgeschwindigkeiten auftreten.

Fig. 11 zeigt die Phase der Fermentation 1 (Glukose und Stroh) zwischen 18 und 28 h mit der Auftragung der volumetrischen CO₂-Outputraten, ferner das Integral sowie die logarithmische und Drittwurzelauftragung. Die lineare Phase bezüglich einer Drittwurzelauftragung entspricht offenbar dem Wachstum auf Glukose.

Fig. 12 zeigt die beiden linearen Phasen in der Drittwurzelauftragung der Fermentation 2 (nur Stroh), und zwar zwischen 29 und 37 sowie zwischen 40 und 50 Stunden.

Fig. 13 zeigt die lineare Phase in der Drittwurzelauftragung zwischen

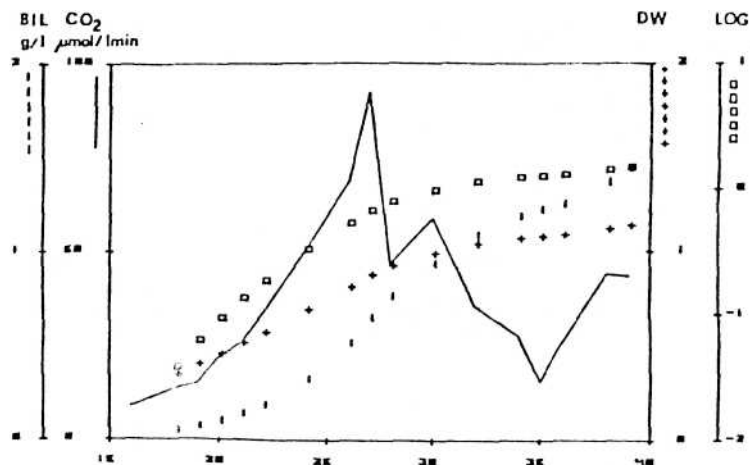


Fig. 11: CO₂- Output Fermentation 1 u. Auftragungen

- 101 -

10 und 35 h von Run Nr. 27 von Nystrom und Andren (1976).

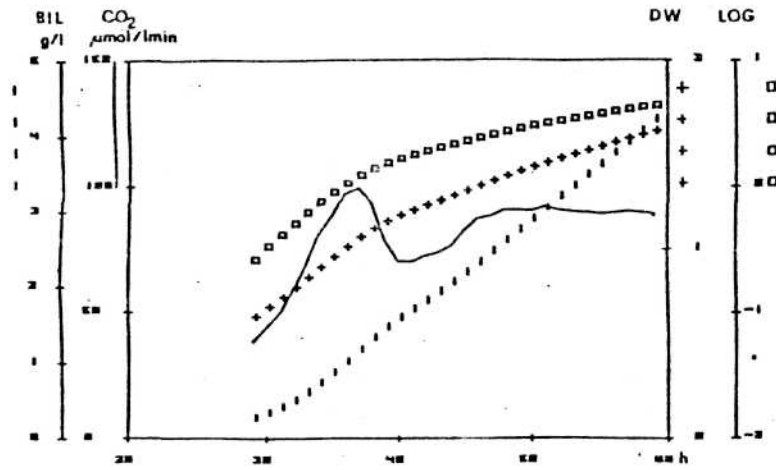


Fig.12: CO₂-Output Ferm.2 u.Auftragungen

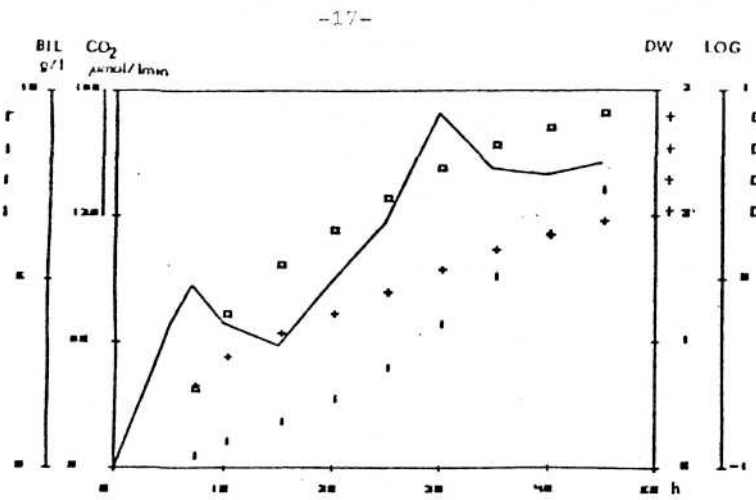


Fig. 13 CO₂-Output, Bilanzierung sowie Linearisierungsversuche mit Dittwurzel und logarithmischer Auftragung in Abhängigkeit von der Kulturdauer von Run Nr. 27 Nystrom und Andren (1976).

| Fermentation | Phase | Fig. | Zeitl. Phasen- begrenzung | Regressionskoeffizienten | |
|--------------|-------|------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | | | direkt | Drittwurzel logarithmisch |
| 1 | 1 | 29 | 18 - 28 h | 0,9766 | 0,9999 |
| 2 | 1 | 34 | 29 - 37 h | 0,9899 | 1,0000 |
| 2 | 2 | 34 | 40 - 50 h | 0,9988 | 1,0000 |
| Run No.27 | 1 | 36 | 10 - 35 h | 0,9840 | 0,9997 |

Tabelle 3

Tab. 3 zeigt eine Zusammenstellung der verschiedenen Fermentationen bezüglich ihrer Phasen in der Drittwurzelauftragung, in Verbindung mit den Regressionskoeffizienten auch für die beiden anderen Auftragsarten.

Es zeigt sich, daß in allen Fällen die Regressionskoeffizienten bezüglich der Drittwurzelauftragung die höchsten Werte erreichten, daß jedoch auch die direkte und die logarithmische Auftragung ebenfalls noch signifikant sind. Sollte das von Marshall und Alexander (1960) aufgestellte Drittwurzelwachstumsgesetz auch hier seine Geltung haben, so allenfalls für die ersten 50 bis 60 Stunden der Fermentation. Danach nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit laufend ab, was wohl mit einer allmählichen Verknappung leicht aufschließer Anteile und dem Zurückbleiben der immer schwerer aufschließbaren Rückstände zusammenhängt.

| Fermentation | Phase | Wachstumsrate (g/l) ^{1/3} /h |
|--------------|-------|---|
| 1 | 1 | 0,058 |
| 2 | 1 | 0,045 |
| 2 | 2 | 0,030 |
| 3 | 1 | 0,052 |
| 3 . | 2 | 0,026 |
| Run No. 27 | 1 | 0,034 |

Tabelle 4

Tab. 4 zeigt die ermittelten spezifischen Wachstumsraten, definiert als Anstieg der linearisierten Drittwurzelauftragungen. Somit konnte gezeigt werden, daß die spezifische Wachstumsrate von Run Nr. 27 sogar niedriger war als die der ersten Phase von Fermentation 2, also ganz das Gegenteil von dem, was auf Grund einer mehr als 7-fachen Enzymausscheidung zu erwarten wäre.

Da die cellulolytischen Mikroorganismen, wie mikroskopische Beobachtungen gezeigt haben, immer in engem Kontakt mit der Cellulose wachsen, kann vermutet werden, daß die abbauenden Enzyme an der Zelloberfläche lokalisiert sind.

Dies könnte über eine Bindung des Glykoproteinanteils der Cellulase an ganz bestimmten Oberflächenstrukturen mit ähnlichem Kohlenhydratanteil erfolgen. Versuche, bei denen von einem Zellwandpräparat Cellulase durch Einsatz von Mannanasen und Proteinase, aber nicht durch Erhöhung der Ionenstärke freigesetzt werden konnten, sprechen für eine kovalente Bindung des Enzyms an Zellwandbestandteile (C.P.Kubicek, unveröff.).

Die berichteten Ergebnisse zeigen somit, daß bei diesem Stamm von *Trichoderma koningii* die Cellulaseausscheidung in das Medium offenbar erst in der Spätphase des Wachstums bzw. nach Wachstumsende erfolgt.

Literatur:

- Ames, E.M. (1966) in:
Meth.in Enzymology 8, 115 - 118, Colowick.N.O. ,
Kaplan eds., Acad.PFess
- Bergmeyer, H.U. (1970)
Meth.enzym.Anal. Vol.2 Galeraight,
- J.C., Smith, J.E! (1969)
J.Gen.Microbiol. 59, 31
- John, E. (1978)
Diplomarbeit TU Wien Kitto, G.B., Kottge, M.E.,
- Bertland, L.H., Murphey, W.H.
Kaplan,N.O.(1967)
Arch.Biochem.Biophys. 121, 224
- Lakshminayarana, K.,Modi, V.V., Shah, V.K. (1969)
Arch.Microbiol. 66, 396, 406 Mandels, M.,
- Andreotti, R., Roche, Ch. (1976)
Biotechn.Bioeng. Symp. 16, 21 - 23
- Marshall, K.C., Alexander, M. (1960)
J.Bact. 80, 412 - 416
- Miller, G.L. (1959)
Anal.Chem. 31, 426 - 428
- Nystrom, J.H., Andren, R.K. (1976)
Process Biochem. 1976, 26 - 34

Ochoa, S. (1955) in :
Meth. in Enzymology 1, 753 - 762 Reardon,
J., Forman, J. A., Leary, A. (1966)
Clin.Chem.Acta 14, 403 - 410 Waygood, E.R.,
Rohringer, R. (1954) in :
Mod.Neth.Plant Analy. 7, 546, Springer-Verlag