

## Neue Methode zur viskosimetrischen Bestimmung der *Michaelis—Menten*-Konstante der $\beta$ -1,4-Glucan-4- glucanohydrolase

(EC 3.2.1.4) — [ $C_x$ -Cellulasen-Enzyme]

Von

**M. Tschetkarov** und **D. Koleff**

Fakultät für Physik der Universität und Institut für Biochemie  
der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften, Sofia, Bulgarien

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 24. Juli 1968)

In Übereinstimmung mit der von uns entwickelten Theorie<sup>32</sup> wurde die *Michaelis—Menten*-Konstante  $K_M = 3,6 \cdot 10^{-5}$  mMol/ml der Hydrolysenreaktion der Natriumcarboxymethylcellulose (Na-CMC) viskosimetrisch bestimmt unter der katalytischen Mitwirkung von  $\beta$ -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.4) — [ $C_x$ -Cellulasen-Enzyme], die aus *Aspergillus oryzae* isoliert wurden. Es wurde auch die Aktivität des Cellulaseenzyms durch die Geschwindigkeitskonstante  $k = 7,41$  cm<sup>3</sup>/g sec bestimmt.

*A New Method for the Viscosimetric Determination of the Michaelis—Menten Constant of  $\beta$ -1.4-Glucan-4-glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.4) [ $C_x$ -Cellulase Enzymes]*

According to the theory developed<sup>32</sup>, a *Michaelis—Menten* constant  $K_M = 3,6 \cdot 10^{-5}$  mmole/ml was found viscosimetrically for the cleavage of sodium carboxymethylcellulose (Na-CMC) by  $\beta$ -1.4-glucan-4-glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.4), a  $C_x$ -cellulase enzyme isolated from *Aspergillus oryzae*. The cellulase activity was also characterized by the rate constant,  $k = 7,41$  cm<sup>3</sup>/g sec.

### Einführung

In Übereinstimmung mit den gegenwärtigen Vorstellungen wird die native Cellulose von einem Komplex celluloselytischer Enzyme (Cellulasen) hydrolytisch abgebaut; diese bestehen aus:

1. Cellulasen, die native, unlösliche Cellulosesubstrate hydrolysieren ( $C_1$ -Cellulaseenzyme<sup>4</sup>, A-Cellulaseenzyme<sup>6</sup>).

2. Cellulasen, die lösliche oder wesentlich veränderte native Cellulose-substrate unter Spaltung der  $\beta$ -1,4-glucosidischen Bindungen an jeder Stelle der Polymeren-Kette (Endohydrolasen) oder nur am Kettenende (Exohydrolasen) hydrolysieren.

3.  $\beta$ -Glucosidasen, die Cellobiose und andere Cello-oligosaccharide hydrolysieren.

4.  $\beta$ -Glucosyltransferasen, die  $\beta$ -verbundene Oligosaccharide aus Cellobiose, Laminaribiose, Methylglucoside oder Salicin bilden.

Dementsprechend kann man die Klassifizierung der Cellulasen, gemäß der internationalen Nomenklatur<sup>2</sup>, als  $\beta$ -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase (EC 3.2.1.4) nur für diejenigen Enzyme annehmen, die  $\beta$ -1,4-Glucosid-Bindungen in  $\beta$ -1,4-Polymeren der Glucose<sup>3</sup> hydrolysieren. In der Literatur haben sich für diese celluloseabbauenden Enzyme einige triviale Benennungen eingebürgert:  $C_x$ -Cellulaseenzyme<sup>4</sup>,  $\beta$ -1,4-Polyglucosidasen<sup>5</sup>, Carboxymethylcellulasen<sup>5</sup> und B-Cellulaseenzyme<sup>6</sup>.

Zur Bestimmung der Aktivität dieser Enzyme werden als Substrate lösliche Derivate der Cellulose verwendet, deren Durchschnitts-Substitutionsgrad (*DS*) niedriger ist als 1,0, wie z. B. Natriumcarboxymethylcellulose (Na-*CMC*), Methylcellulose<sup>4, 7, 8</sup>, Hydroxyäthylcellulose<sup>4, 9-11</sup>, Cellulosesulfat<sup>12, 13</sup>, Sulfoäthylcellulose<sup>14</sup>, Glykolcellulose<sup>15</sup> u. a. Unter diesen Substraten findet Na-*CMC* die größte Anwendung; deshalb bezeichnet man die Enzyme dieser Gruppe auch als Carboxymethylcellulasen<sup>5</sup>.

Der durch  $C_x$ -Cellulaseenzyme katalysierte Abbau bzw. die Hydrolyse der löslichen Cellulosederivate kann grundsätzlich durch zwei Meßmethoden verfolgt werden<sup>16</sup>:

1. Chemische Methoden — Zunahme an reduzierenden Zuckern im Reaktionsmedium.

2. Physikalische Methoden — Abnahme der Viskosität der verwendeten Substrate wegen Abnahme ihres Molekulargewichts.

Da in der Literatur eine ausreichende Theorie zur viskosimetrischen Bestimmung der kinetischen Konstanten von Enzym—Substrat-Reaktionen fehlt, wurden sie mit ausschließlich chemischen (kolorimetrischen) Methoden bestimmt<sup>5</sup>: Arsenmolybdatreaktion, Jodoxydation (in alkalischem Medium), Reaktion mit Dinitrosalicylsäure, Ferrocyanidreaktion u. a. So bestimmte man die *Michaelis—Menten*-Konstante ( $K_M$ ), welche die Verwandtschaft zwischen dem Enzym und dem Substrat im Verlauf der Enzymreaktion definiert. Sie wurde meistens in mg/ml für einige Enzym—Substrat-Paare bestimmt, weil man das Molekulargewicht des angewandten Enzyms nicht kannte (Tab. 1).

Tabelle 1

| $C_x$ -Cellulaseenzyme von Mikroorganismen               | Molgew. d. Enzyms  | Substrat                 | $K_M$ (mg/ml)   |
|--|--|--------------------------|---|
| <i>Aspergillus niger</i> <sup>17</sup>                   | —  | Cellulose-Dextrin-Sulfat | 0,25  |
| <i>Aspergillus oryzae</i> <sup>18</sup>                  | —  | Na-CMC                   | $4,4 \cdot 10^{-3}$ *                                       |
| <i>Aspergillus oryzae</i> <sup>18</sup>                  | —  | Cellodextrine            | $3,2 \cdot 10^{-3}$ *                                       |
| <i>Myrothecium verrucaria</i> <sup>19</sup>              | 63 000 <sup>20</sup><br>(55 000;<br>30 000 u.<br>5300) <sup>21</sup><br>49 000 <sup>22</sup> | Na-CMC                   | 0,50  |
| <i>Penicillium chrysogenum notatum</i> <sup>24, 25</sup> | 32 000 <sup>26</sup>   | Na-CMC                   | 0,07  |
| <i>Pestalotiopsis westerdijkii</i> <sup>23</sup>         | —  | Na-CMC                   | 1,60  |
| <i>Pestalotiopsis westerdijkii</i> <sup>23</sup>         | —  | Cellulosesulfat          | 1,40  |
| <i>Ruminococcus albus</i> <sup>27, 28</sup>              | —  | Na-CMC                   | 0,80  |
| <i>Trichoderma viride</i> <sup>29</sup>                  | —  | Na-CMC                   | 0,90—1,42   |
| <i>Trichoderma viride</i> <sup>29</sup>                  | —  | Cellulosesulfat          | 0,70—1,39   |
| <i>Trichoderma viride</i> <sup>30</sup>                  | 42 000 <sup>30</sup>   | Oligomere                | 1—190 · 10 <sup>-4</sup> * u.<br>6—220 · 10 <sup>-5</sup> * |

\* mMol/ml

In einer früheren Arbeit<sup>31</sup> haben wir eine Theorie entwickelt, die es ermöglicht, den Beginn bestimmter Enzymreaktionen kinetisch zu verfolgen und die Aktivität des Enzyms in internationalen Einheiten zu bestimmen. In einer weiteren Arbeit<sup>16</sup> wurden diese Schlußfolgerungen zur viskosimetrischen Verfolgung der Kinetik der Hydrolysereaktion von Na-CMC unter der katalysierenden Mitwirkung von  $C_x$ -Cellulaseenzyme (von *Aspergillus oryzae* — Präparat Luizym®\*) angewandt; die Enzymaktivität wurde in internationalen Einheiten bestimmt.

Unsere früheren Voraussetzungen und Schlußfolgerungen<sup>31</sup> haben wir aus allgemeineren theoretischen Gründen<sup>32</sup> erweitert. Das gab uns die Möglichkeit, unsere früheren Voraussetzungen strenger zu sichern sowie neue Folgerungen für die viskosimetrische Verfolgung der Kinetik bestimmter Enzymreaktionen zu ziehen. Diesen Schlußfolgerungen entsprechend wurde eine neue Methode zur viskosimetrischen Bestimmung der *Michaelis—Menten*-Konstante ( $K_M$ ) (in Molarkonzentration) aufgestellt.

In der vorliegenden Arbeit werden diese Schlußfolgerungen zur viskosimetrischen Bestimmung der *Michaelis—Menten*-Konstante ( $K_M$ ) in der Hydrolysereaktion von Na-CMC unter der katalytischen Mit-

\* Fa. Luitpold-Werk, D-8 München 25, Zielstattstr. 9—15.

wirkung von  $C_x$ -Cellulaseenzymen, die aus *Aspergillus oryzae* isoliert wurden, angewendet.

### Ausgangssubstanzen und Meßmethode

1. Substrat: Wir benutzten bei unseren Untersuchungen Präparate von Na-*CMC* (Präparate Tylose C®\*), die verschiedene mittlere Molekulargewichte ( $\mu_{S0}$ ) — 200 000, 140 000 und 115 000 — hatten. Aus den genannten Tylose-C-Arten wurden Substratlösungen mit verschiedener Konzentration  $[S]$  (mg/ml) durch Auflösen von Na-*CMC* im entsprechenden Volumen eines Acetatpuffers von pH 4,5 hergestellt. Nach Stehenlassen über Nacht wurden die unlöslichen Celluloseanteile durch Zentrifugieren (10 Min. bei 2000 UpM) abgetrennt. Die so gewonnenen klaren Lösungen wurden, wenn möglich, sofort verwendet<sup>29</sup> oder im Kühlschrank bei 0—4° C einen Tag aufbewahrt.

2. Enzym: Als  $C_x$ -Cellulaseenzym wurde das Präparat Luizym® verwendet, das zu diesem Zweck eigens gereinigt und uns von der Fa. Luitpold-Werk, München, überlassen wurde. Seine Aktivität erwies sich als ungefähr 3,6mal höher als die eines in einer vorangehenden Arbeit<sup>16</sup> zu ähnlichen Zwecken angewandten Enzyms. Es wurden Lösungen durch Auflösen gefriergetrockneten Enzyms im entsprechenden Volumen eines Acetatpuffers pH 4,5 hergestellt. Die so gewonnenen klaren Lösungen wurden, wenn möglich, sofort verwendet oder im Kühlschrank bei 0—4° C (nicht länger als 4—5 Tage) aufbewahrt.

3. Meßmethode: Alle viskosimetrischen Messungen wurden mit einem Höppler-Viskosimeter\*\* bei einer Arbeitstemperatur von 25° C in einer Meßküvette von 0,01 und bei einer Belastung von 10 g/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Der volle Meßgang des Apparates von 30 mm wurde mit Hilfe eines Sekundenzählers mit einer Genauigkeit von 0,2 sec abgelesen. Nach Vermischung der Enzym—Substrat-Lösungen wurde die Enzymreaktion in bestimmten Zeitintervallen (je 2,5 Min.) durch die Viskositätsabnahme verfolgt.

### Ergebnisse und Diskussion

Zur Verfolgung der Änderung im Molekulargewicht des Substrats unter der katalytischen Wirkung der  $C_x$ -Cellulaseenzyme wurde die Abhängigkeit von *Baker*<sup>33</sup> verwendet, welche die relative Viskosität mit der Viskositätszahl und der Konzentration des Substrats verknüpft und in welcher nach *Hess* und *Philipoff*<sup>34</sup>  $n = 8$  ist.

$$\eta_{\text{rel}} = \left( 1 + \frac{[\eta][S]}{n} \right)^n. \quad (1)$$

Um nachzuprüfen, inwiefern Relation (1) den Versuchangaben für Na-*CMC* als Substrat entspricht, wurden die früher festgesetzten Viskositätszahlen<sup>31</sup>  $[\eta]^*$  für verschiedene Molekulargewichte verwendet. Abb. 1 vergleicht die gemessenen Werte von  $\eta_{\text{rel}}$  (für drei Molekulargewichte) mit

\* Fa. Kalle & Co. AG., D-6202, Wiesbaden-Biebrich.

\*\* Fa. VEB Prüfgeräte-Werk, Medingen, Dresden.

den nach Gl. (1) berechneten, wobei  $n = 8$ , wie in<sup>34</sup> vorgeschlagen. In den Grenzen der Meßgenauigkeit entspricht Relation (1) den Experimentalergebnissen für Konzentrationen bis zu 4 mg/ml.

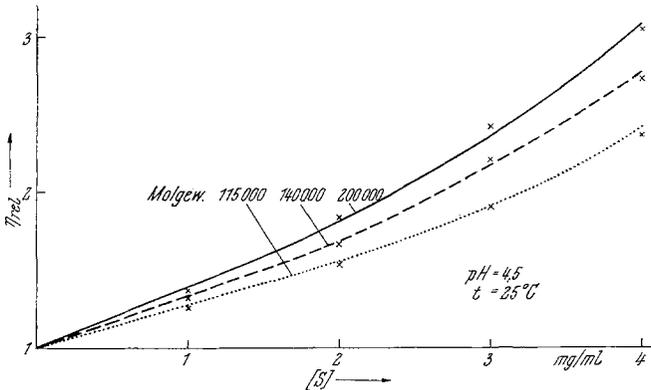


Abb. 1. Abhängigkeit zwischen den relativen Viskositäten ( $\eta_{rel}$ ) und den Konzentrationen des Substrats Na-CMC verschiedenen Molgewichts. Kurvenzüge nach Gl. (1) berechnet.  $\times$  = gemessene Werte

Wenn Relation (1) mit der Abhängigkeit von *Mark—Howink*<sup>35</sup>, die den Zusammenhang zwischen der Viskositätszahl und dem Molekulargewicht des abzubauenen Substrats

$$[\eta] = K \mu_s^a \quad (2)$$

definiert, verbunden wird, so ergibt sich die Abhängigkeit

$$\mu_s = \sqrt[n]{\frac{n \left( \sqrt[n]{\eta_{rel}} - 1 \right)}{K [S]}}, \quad (3)$$

die es ermöglicht, in jedem Zeitpunkt der Enzymreaktion das Molekulargewicht des in Abbau befindlichen Substrats zu bestimmen. In dieser Abhängigkeit (3) verwendeten wir für die Konstanten  $K$  und  $a$  von (2) die vorher ermittelten Zahlenwerte<sup>16</sup>

$$K = 0,00158, \quad a = 0,43.$$

Man erhielt also das Molekulargewicht  $\mu_s$  des abzubauenen Substrats, indem die relative Viskosität  $\eta_{rel}$  in Zusammenhang mit der Reaktionsdauer  $t$  (0—5 Stunden) unter Optimalbedingungen durch Relation (3) berechnet wurde.

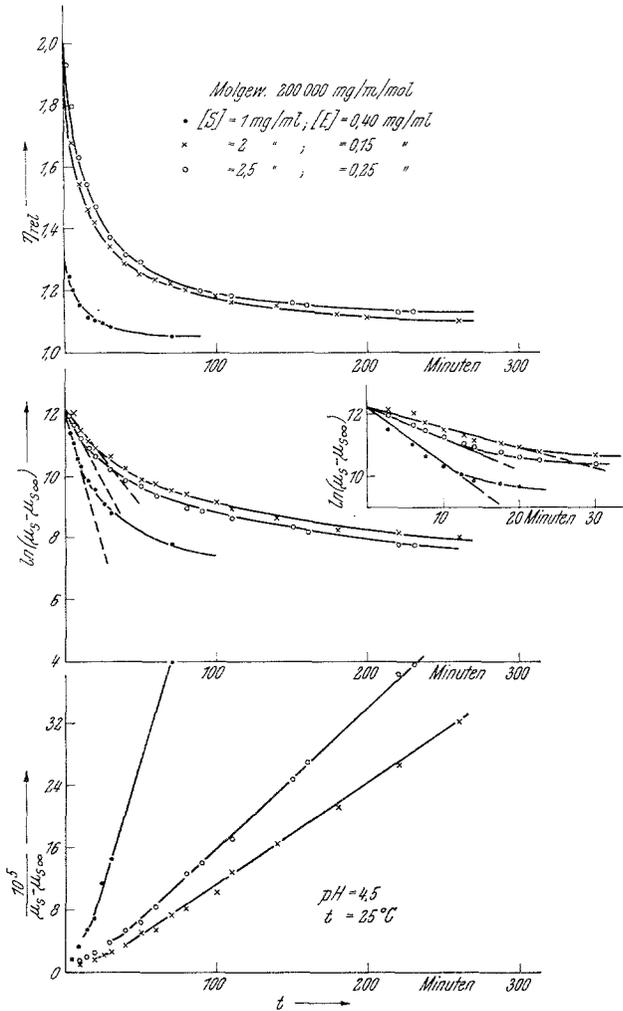


Abb. 2. Abhängigkeit von  $\eta_{rel}$ ,  $\ln(\mu_s - \mu_{s\infty})$  und  $(\mu_s - \mu_{s\infty})^{-1}$  von der Reaktionszeit  $t$  für die Reaktion zwischen Na-CMC (Molgewicht 200 000) und  $C_x$ -Cellulaseenzyme bei verschiedenen Konzentrationen  $[E]$  und  $[S]$  des Enzyms und des Substrats. In der Mitte oben rechts dieselbe Abhängigkeit in verlängertem Zeitmaßstab

Werden die so aus (3) ermittelten Werte von  $\mu_s$  in Relation (22)<sup>32</sup>, welche den Beginn der Enzymreaktion

$$\mu_s - \mu_{s\infty} = (\mu_{s0} - \mu_{s\infty}) e^{-k[E]t} \quad (22)^{32} = (4)$$

beschreibt, und in Relation (24)<sup>32</sup>, die den zweiten Teil der Enzymreaktion

$$\frac{1}{\mu_S - \mu_{S\infty}} = \frac{1}{\mu_{S0} - \mu_{S\infty}} + \frac{k^* [E]}{[S]} t \quad (24)^{32} = (5)$$

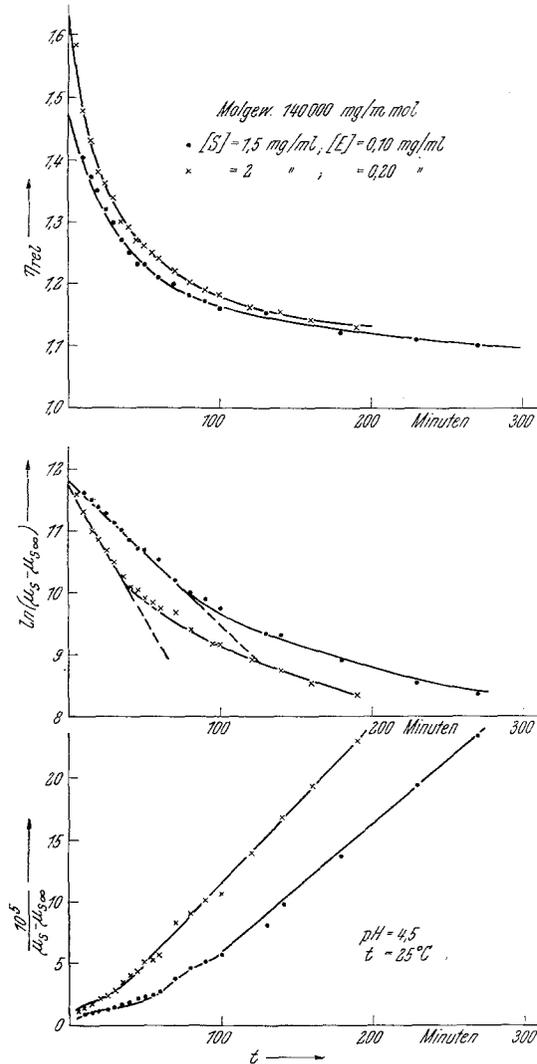


Abb. 3. Wie Abb. 2, jedoch für ein Molgewicht von 140 000

anzugeben gestattet, eingesetzt, so kann die Kinetik der Enzym—Substrat-Reaktion in jedem Zeitpunkt  $t$  verfolgt werden. Relation (4) kann

\* Die Viskositätszahl für Molgewicht 115 000 wurde nachträglich bestimmt.

auch in logarithmischer Maßstab ausgedrückt werden, wie das in einer vorangehenden Arbeit<sup>16</sup> gezeigt wurde.

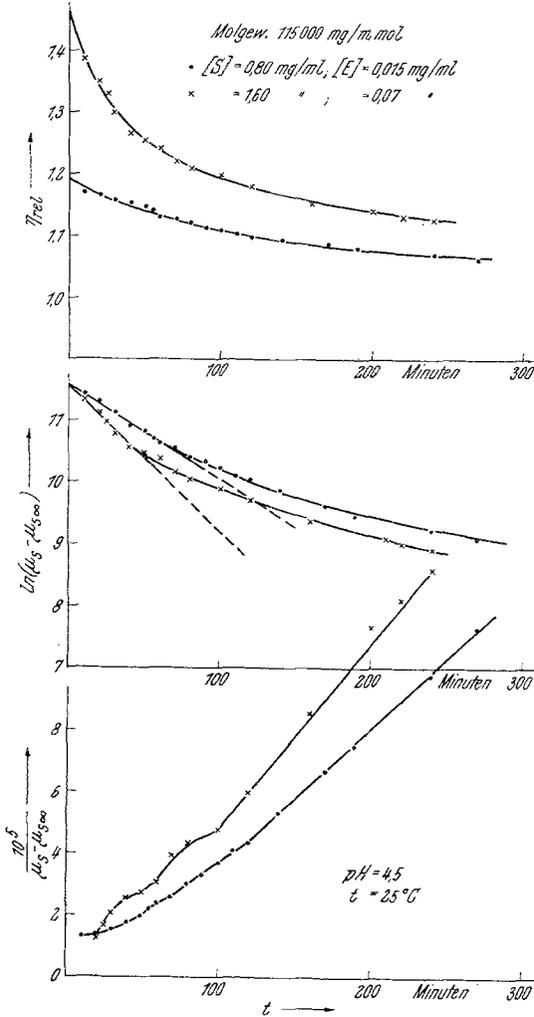


Abb. 4. Wie Abb. 2, jedoch für ein Molgewicht von 115 000

In den Abb. 2, 3 und 4 sind die experimentell festgesetzten Werte von  $\eta_{rel}$ ,  $\ln(\mu_s - \mu_{s\infty})$  und  $(\mu_s - \mu_{s\infty})^{-1}$  als Funktion von der Reaktionszeit  $t$  eingetragen.

Aus der graphischen Darstellung der Abb. 2, 3 und 4 wurden die Neigungen

$$\frac{1}{\tau} = k[E] \quad (6)$$

laut Relation (4) und die Neigungen

$$\frac{1}{\tau^*} = k^*[E]/[S] \quad (7)$$

laut Relation (5) entnommen. Aus der letzteren bestimmte man die Abhängigkeit

$$\frac{[S]}{\tau^*} = k^*[E] \quad (8)$$

für die einzelnen Enzym—Substrat-Systeme, definiert für die verschiedenen Ausgangsmolgewichte mit festgesetzten Konzentrationen  $[S]$  und  $[E]$  des Enzyms und des Substrats. Tab. 2 zeigt die erhaltenen Experimentalergebnisse.

Tabelle 2

| $\mu s_0$                       | $[S]$                         | $[E]$                         | $\frac{1}{\tau} \cdot 10^2$ | $\frac{[S]}{\tau^*} \cdot 10^7$     | $K_M \cdot 10^5$                |
|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| $\frac{\text{mg}}{\text{mMol}}$ | $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ | $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ | $\frac{1}{\text{min}}$      | $\frac{\text{mMol}}{\text{ml min}}$ | $\frac{\text{mMol}}{\text{ml}}$ |
| 200 000                         | 1                             | 0,40                          | 18                          | 64                                  | 3,55                            |
|                                 | 2                             | 0,15                          | 6,25                        | 27                                  | 4,33                            |
|                                 | 2,5                           | 0,25                          | 10,5                        | 45                                  | 4,27                            |
| 140 000                         | 1,5                           | 0,10                          | 4,66                        | 16,3                                | 3,49                            |
|                                 | 2                             | 0,20                          | 8,75                        | 26                                  | 2,98                            |
| 115 000                         | 0,8                           | 0,015                         | 1,5                         | 3,68                                | 2,45                            |
|                                 | 1,6                           | 0,07                          | 2,34                        | 9,7                                 | 4,11                            |

$$K_M = (3,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} \text{ mMol/ml} = 3,6 \cdot 10^{-5} \text{ mMol/ml} \pm 5,5\%$$

In der letzten Kolonne dieser Tabelle sind laut Relation (25)<sup>32</sup>

$$K_M = \frac{k^*}{k} = \frac{[S]/\tau^*}{1/\tau} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{N_0 k_{+1}} \quad (25)^{32} = (9)$$

die Werte der *Michaelis—Menten*-Konstante ( $K_M$ ) für die einzelnen Bestimmungen eingetragen; unter der Tabelle steht der Durchschnittswert und der Durchschnittsfehler bei dieser Bestimmung.

Die letzte Kolonne der Tab. 2 weist darauf hin, daß die ermittelten Werte von  $K_M$  bei den einzelnen Bestimmungen sich etwas von ihrem Durchschnittswert unterscheiden. Wahrscheinlich hängt das von Abweichungen in der

Konzentration  $[S]$  der verwendeten Substrate ab. Bezeichnen wir die aufgelöste Substratmasse mit  $M_{SL}$  und die hydrolysierende Masse im Volumen  $V$  mit  $M_S$ , so ist die experimentell definierte Konzentration

$$[S]_L = \frac{M_{SL}}{V} = \frac{M_{SL}}{M_S} \cdot \frac{M_S}{V} = \frac{[S]}{r},$$

worin  $r = M_S/M_{SL} \leq 1$  und  $[S] = r[S]_L$  ist.

Da  $r$  bei den einzelnen Versuchen in gewissen Grenzen variabel ist, variiert auch die sich hydrolysierende Masse des Substrats, d. h.  $[S]$ . Diese Variationen wirken sich wahrscheinlich auch in den festgelegten Werten für  $K_M$  von Relation (9) aus.

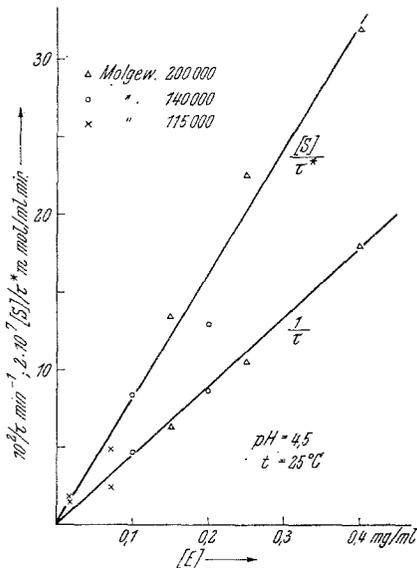


Abb. 5. Gl. (6) und (8), graphisch ausgedrückt nach den Werten von Kol. 4 und 5 der Tab. 2

In der Abb. 5 sind die Werte aus der 4. und 5. Kolonne der Tab. 2 gegen die Abhängigkeiten (6) und (8) eingetragen, welche die Linearität zwischen den Enzymkonzentrationen und diesen Werten definieren. Die Abbildung spricht dafür, daß in den Grenzen der Experimentalgenauigkeit diese Gesetzmäßigkeiten eingehalten werden. Aus dem Wert der Relaxationsdauer  $1/\tau$ , die durch die Neigung der Geraden in Abb. 5 definiert wird, bestimmt man die Geschwindigkeitskonstante der Enzymreaktion

$$k = \frac{1}{\tau [E]} = 0,445 \text{ ml/min g} = 7,41 \text{ cm}^3/\text{sec g}$$

so, wie das auch vorher<sup>16</sup> getan wurde. Dieser Wert erlaubt es, die anderen internationalen Einheiten für die Enzymaktivität<sup>16</sup> zu berechnen. Der so bestimmte Wert  $k$  erwies sich als etwa 3,6mal größer als der Wert des vorher<sup>16</sup> untersuchten Enzyms, d. h., es erscheint 3,6mal aktiver wegen des angewandten Reinigungsverfahrens.

Für die Überlassung des speziell gereinigten Enzympräparats, mit dessen Hilfe die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, danken die Verfasser auch an dieser Stelle herzlichst der Fa. Luitpold-Werk, München.

<sup>1</sup> V. I. Bilai, in: Probleme der Biosynthese, der Struktur und der Funktionen der Biopolymeren, Nauk. Dumka, Kiev, S. 202, 1967.

<sup>2</sup> Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Report. Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press 1961.

<sup>3</sup> D. Whitaker, in: Enzym. hydrol. cellul., Ed. E. Reese, Pergamon Press, p. 51, 1963.

<sup>4</sup> E. Reese, R. Siu und H. Levinson, J. Bacteriol. **59**, 485 (1950).

<sup>5</sup> G. Halliwell, in: Enzym. hydrol. cellul., Ed. E. Reese, Pergamon Press, p. 71, 1963.

<sup>6</sup> K. Selby, in: Enzym. hydrol. cellul., Ed. E. Reese, Pergamon Press, p. 33, 1963.

<sup>7</sup> E. Husemann, E. Loes und R. Lötterle, Makromol. Chem. **6**, 163 (1951).

<sup>8</sup> R. Aitken, B. Eddy, M. Ingram und C. Weurman, Biochem. J. **64**, 63 (1956).

<sup>9</sup> R. Blum und W. Stahl, Text. Res. J. **22**, 178 (1952).

<sup>10</sup> S. Lindenfors, Acta Chem. Scand. **16**, 1111 (1962).

<sup>11</sup> W. Klop und P. Kooiman, Biochem. Biophys. Acta **99**, 102 (1965).

<sup>12</sup> R. Grimes, C. Dunkan und C. Hoppert, Arch. Biochem. Biophys. **68**, 412 (1957).

<sup>13</sup> H. Levinson, M. Mandels und E. Reese, Arch. Biochem. Biophys. **31**, 351 (1951).

<sup>14</sup> E. Reese, in: Marine Boring and Fouling Organisms, Ed. D. Ray, Washington Press, p. 265, 1959.

<sup>15</sup> T. Iwasaki, K. Tokuyasu und M. Funatsu, J. Biochem. [Tokyo], **55**, 30 (1964); J. Ferment. Technol. **41**, 340 (1963).

<sup>16</sup> M. Tschetkarov, D. Koleff und S. Banikova, Mh. Chem. **98**, 1916 (1967).

<sup>17</sup> A. Clarke und B. Stone, Biochem. J. **96**, 802 (1965).

<sup>18</sup> M. Jernin, Austral. J. Sci. Res. (B) **5**, 409, 433 (1952).

<sup>19</sup> G. Halliwell, Biochem. J. **79**, 185 (1961).

<sup>20</sup> D. Whitaker, J. Colvin und W. Cook, Arch. Biochem. Biophys. **49**, 257 (1954).

<sup>21</sup> K. Selby und M. Mailland, Biochem. J. **94**, 578 (1965).

<sup>22</sup> P. Datta, K. Hanson und D. Whitaker, Canad. J. Biochem. Physiol. **41**, 697 (1963).

<sup>23</sup> M. Mandels, Plant. Physiol. **29**, 18 (1954).

<sup>24</sup> K. Almin und K. E. Eriksson, Biochim. Biophys. Acta **139**, 238 (1967).

<sup>25</sup> K. Almin, K. E. Eriksson und C. Jansson, Biochim. Biophys. Acta **139**, 248 (1967).

<sup>26</sup> G. Petterson und J. Porath, Methods Enzymol. **8**, 603 (1966).

<sup>27</sup> G. Halliwell, Biochem. J. **85**, 67 (1962).

- <sup>28</sup> *J. M. Leatherwood*, *Appl. Microbiol.* **13**, 771 (1965).
- <sup>29</sup> *M. Mandels* und *E. Reese*, in: *Enzym. hydrol. cellul.*, Ed. *E. Reese*, Pergamon Press, p. 115, 1963.
- <sup>30</sup> *K. King*, *J. Ferment. Technol.* **43**, 79 (1965).
- <sup>31</sup> *M. Tschetkarov* und *D. Koleff*, *Mh. Chem.* **98**, 1908 (1967).
- <sup>32</sup> *M. Tschetkarov* und *D. Koleff*, *Mh. Chem.* **100**, 976 (1969).
- <sup>33</sup> *F. Baker*, *J. Amer. Chem. Soc.* **103**, 1653 (1913).
- <sup>34</sup> *K. Hess* und *W. Philippoff*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **70**, 639 (1937).
- <sup>35</sup> *H. Mark*, *Der feste Körper*, Hirzel, Leipzig, S. 103, 1938; *R. Howink*, *J. prakt. Chem.* **157**, 15 (1940).