DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **278 818 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **C 12 N 9/88**

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 324 052 2	(22)	27.12.88	(44)	16.05.90

(71) Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR, Institut für Kartoffelforschung, Groß-Lüsewitz, 2551, DD

(72) Henniger, Hans, Dr. habil.; Wegener, Christina, Dr.; Baumann, Helga; Pippig, Rainer, DD

(54) Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Pektatlyase (E.C.4.2.2.2.) aus Erwinia carotovora

(55) biotechnologisches Verfahren; Pektatlyase-Herstellung; Erwinia carotovora; Submerskultur; komplexes Kulturmedium; Fermentation

(57) Die Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von Pektatlyase (E.C.4.2.2.2.) mittels eines speziell selektierten und angepaßten Produktionsstammes des Bakterium Erwinia carotovora und diskontinuierlicher oder semikontinuierlicher Submerskultur in einem komplexen Kulturmedium sowie einer für die Enzymsynthese optimalen Prozeßführung. Das erfindungsgemäße Kulturverfahren ergibt eine hohe Pektatlyaseaktivität im Kulturfiltrat, welches durch die Fermentation nur gering verfärbt wird, keine Geruchsbildung aufweist, wenig schleimbildende Substanzen enthält und sich ohne Schwierigkeiten thermisch bzw. durch Ultrafiltration aufkonzentrieren läßt. Die Pektatlyase findet als Pflanzengewebe mazerierendes transeliminativ spaltendes pektolytisches Enzym in der Lebensmitteltechnologie und für wissenschaftliche Zwecke ein zunehmendes Interesse.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Pektatlyase (E.C.4.2.2.2.) aus Erwinia carotova, **dadurch gekennzeichnet,** daß ein spezifischer Stamm des pflanzenpathogenen Bakteriums Erwinia carotovora, hinterlegt bei der Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen in der DDR im ZIMET Jena unter der Reg.-Nr. IMET 11311, in diskontinuierlicher oder semikontinuierlicher Submerskultur in einem komplexen Kulturmedium kultiviert wird und das Enzym extrazellulär in die Kulturlösung ausscheidet.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet,** daß ein volkswirtschaftlich vorteilhaftes komplexes Kulturmedium, bestehend aus weitgehend einheimischen und gut lagerfähigen Bestandteilen $(NH_4)_2HPO_4$, KNO_3, Na_2SO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $Al_2(SO_4)_3$ sowie Soja-Extraktionsschrot, Zuckerrübenmelasse, Zuckerrübenschnitzel oder (und) Samenschalen von Trockenerbsen, eine hohe und gut reproduzierbare Pektatlyase-Ausbeute ermöglicht und das Kulturfiltrat nur eine geringe Verfärbung und keine Geruchsbildung aufweist.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet,** daß durch eine optimale Prozeßführung mittels Limitierung des Sauerstoffgehaltes sowie einer optimalen CO_2-Konzentration in der Kulturlösung zu einem bestimmten Zeitpunkt in der logarithmischen Wachstumsphase die Synthese und Exkretion der Pektatlyase gefördert wird.
4. Verfahren nach Punkt 1–3, **dadurch gekennzeichnet,** daß bei einer diskontinuierlichen Kultur die Fermentation nach 20 bis 24 Stunden beendet ist, aber auch eine semikontinuierliche Kultur mit dem gleichen selektierten Erwinia-Stamm im gleichen komplexen Kulturmedium erfolgen kann.
5. Verfahren nach Punkt 1–4, **dadurch gekennzeichnet,** daß das von Schleimstoffen nahezu freie Kulturfiltrat durch Vakuumkonzentrierung, vorzugsweise jedoch durch Membranfiltration (Ultrafiltration) ohne bemerkenswerte Aktivitätsverluste auf das 20 bis 40fache aufkonzentriert werden kann.
6. Verfahren nach Punkt 1–5, **dadurch gekennzeichnet,** daß das durch Ultrafiltration weitgehend entsalzte und von niedermolekularen Begleitstoffen befreite Enzymkonzentrat durch Zusatz von unbedenklichen Enzymstabilisatoren ($NaHCO_3$ + $CaCl_2$) ohne Aktivitätsverluste aufbewahrt werden kann.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein verbessertes, industriell anwendbares biotechnologisches Verfahren zur Herstellung des pektinspaltenden Enzyms Pektatlyase mittels speziell selektierter und angepaßter Stämme des phytopathogenen Bakteriums Erwinia carotovora und eines geeigneten, ökonomisch vorteilhaften Kulturmediums.
Das Enzym Pektatlyase gewinnt, teilweise in Kombination mit Zellulase spaltenden Enzymen, in der Lebensmitteltechnologie zur Mazeration bzw. vollständigen Verflüssigung von pflanzlichem Gewebe, ein zunehmendes Interesse, wird aber auch als Biochemikalie für wissenschaftliche Untersuchungen (z. B. zur Isolierung pflanzlicher Protoplasten) eingesetzt.
Mögliche Anwendungsgebiete der Pektatlyase sind durch nachstehend aufgeführte Patentschriften belegt:

DD 158 610:	Verfahren zur enzymatischen Vorbehandlung von Hülsenfrüchten und stückigem Trockengemüse
DD 216 617:	Verfahren zur enzymatischen Verflüssigung von Gemüse und Speisekartoffeln
DD 247 147:	Verfahren und Vorrichtung zur Behandlung von Leguminosensamen und stückigem Gemüse
DD 247 923:	Verfahren zur Herstellung von oligemeren 4-0-α-D-(4,5-Dehydrogalacturonosyl)-D-galacturonaten bzw. -galacturonsäuren
DD WP C12P/306 9752:	Applikation von Enzymkulturlösungen aus Erwinia carotovora für den Aufschluß von Cerealienrohstoffen

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bei den bisher bekannten und teilweise angewendeten Verfahren:

DD AP 94 059:	Verfahren zur Herstellung eines Enzympräparates
DD WP 158 648:	Verfahren zur Herstellung von Pektatlyase
sowie	
WP (V12N/266 6651):	Verfahren zur mikrobiellen Herstellung komplexer Enzymgemische zur Gewebemazeration

wurden als extrazellulär Pektatlyase bildende Mikroorganismen Bacillus polymyxa oder speziell selektierte Stämme des phytopathogenen Bakteriums Erwinia carotovora und als Kulturmedien halbsynthetische bzw. komplexe Nährlösungen verwendet. Erstere enthalten als Induktoren der Pektatlyase-Synthese und Ausschüttung bestimmte Aminosäuren und Pektin und sind aus wirtschaftlichen Gründen für eine Enzymherstellung im Labor- und nicht im technischen Maßstab geeignet. Das letzte Verfahren beruht auf der Verwendung von Abprodukten der kartoffelverarbeitenden Industrie (Kartoffelzellsaft und Pülpe) als Induktoren der Pektatlyasebildung. Trotz der ökonomisch günstigen Parameter wirkt sich die sortenabhängige und verarbeitungsmäßig bedingte wechselnde Zusammensetzung dieser Abprodukte teilweise sehr nachteilig auf die Höhe der Enzymproduktivität aus. Diese relativ leicht verderblichen Bestandteile des Nährsubstrates sind saisonbedingt nur eine relativ kurze Zeitspanne verfügbar, wodurch keine ganzjährige Produktion gewährleistet ist. Außerdem wird durch den Fermentationsprozeß eine intensive Dunkelverfärbung des Kulturfiltrates bewirkt, die von einer starken und unangenehmen Geruchsbildung begleitet ist, wodurch eine zusätzliche aufwendige Reinigungsprozedur erforderlich wird. Versuche, die in den beiden Verfahren verwendeten Enzyminduktoren durch verfügbare komplexe Medien zu ersetzen, erbrachten mit diesem, speziell an das genannte Kartoffelmedium angepaßten Erwinia-Stamm, nur eine ungenügende geringe Pektatlyase-Ausbeute.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein verbessertes, industriell anwendbares biotechnologisches Verfahren zur Herstellung extrazellulärer Pektatlyase unter Verwendung eines dafür selektierten und angepaßten Stammes des kartoffelpathogenen Bakteriums Erwinia carotorova in Submerskultur in herkömmlichen Rührfermentoren mittels eines wenig aufwendigen und gut reproduzierbaren optimierten Fermentationsprozesses mit ökonomisch günstigen Kulturmedien aus weitgehend einheimischen und ständig verfügbaren Rohstoffen.
Das Kulturfiltrat soll eine hohe Enzymaktivität besitzen, nur eine geringe Verfärbung und Geruchsbildung aufweisen und keine die Aufarbeitung erschwerenden schleimigen Substanzen enthalten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die aufgezeigten Nachteile der bisherigen Verfahren zur Herstellung von Pektatlyase im technischen Maßstab zu beseitigen und mittels speziell selektierter und angepaßter Wildstämme von Erwinia carotovora in einem kurzzeitigen Fermentationsprozeß mit einem wirtschaftlich vorteilhaften Kulturmedium, bestehend aus weitgehend einheimischen und gut lagerfähigen Rohstoffen, eine saisonunabhängige und gut reproduzierbare Produktion mit einer erhöhten Ausbeute und einwandfreier Qualität zu gewährleisten. Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, daß aus einer Vielzahl von Einzelisolaten aus schwarzbeinigkeitskranken Kartoffelstengeln unterschiedlicher Sortenzugehörigkeit und Provenienz überraschenderweise ein Stamm des Erregers Erwinia carotorova mit den gewünschten Eigenschaften selektiert und durch laufende Anreicherungskulturen in seiner Leistungsfähigkeit weiter gesteigert werden konnte. Als wichtigstes Selektionsmerkmal diente die Höhe der Pektatlyaseaktivität ($\leq 40\,U \cdot ml^{-1}$) in einem flüssigen Kulturmedium, bestehend aus anorganischen Salzen, Soja-Extraktionsschrot, gemahlenen Zuckerrübenschnitzel oder (und) Trockenerbsen-Schalen sowie eine möglichst hohe Konstanz des Merkmals Pektatlyase-Produktion nach einer mehr oder weniger häufigen Passage der Stammkulturen auf einem Agarsubstrat. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird der Produktionsstamm (hinterlegt bei der Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen der DDR im ZIMET Jena unter der Reg.-Nr. IMET 11311) zur Erhaltung der Leistungsmerkmale und des guten Wachstums als „Frostkultur" bei einer Temperatur unter −30°C aufbewahrt und zur Anlage von Impfkulturen auf Agar-Schrägröhrchen überimpft oder auch direkt in das flüssige Kulturmedium für Vorkulturen übertragen.
Erfindungsgemäß hat das Kulturmedium sowohl für die Vorkulturen als auch für die Produktionsansätze die gleiche Zusammensetzung und besteht aus den anorganischen Bestandteilen $(NH_4)_2HPO_4$, KNO_3, Na_2SO_4, $CaCl_2$, $Al_2(SO_4)_3$ und den organischen komplexen Komponenten Soja-Extraktionsschrot, Zuckerrübenmelasse sowie Zuckerrübentrockenschnitzel und (oder) Samenschalen von Trockenerbsen. Dieses Kulturmedium ermöglicht dem dafür selektierten genannten Stamm ein gutes Wachstum und bewirkt in einem kurzzeitigen und optimierten Fermentationsprozeß eine hohe Pektatlyaseaktivität, wobei das Kulturfiltrat nur wenig verfärbt ist und keinen unangenehmen Geruch aufweist. Die Wasserstoffionenkonzentration (pH) des hitzesterilisierten Kulturmediums liegt im Bereich von pH 6,8–7,1 und bedarf während der Fermentation keiner Korrektur.
Die Vorkultur I wird als Schüttelkultur (siehe Beispiel 1) in Erlenmeyer- oder Rundkolben in bekannter Weise bei einer Inkubationstemperatur zwischen 20 und 30°C, vorzugsweise bei 25°C durchgeführt. Die Kulturdauer beträgt 20–24 Std., wonach eine Bakteriendichte von $5 \cdot 10^9$–$1 \cdot 10^{10}$ Bakt. $\cdot ml^{-1}$ erreicht werden. Zur Beimpfung nachfolgender Vorkulturen oder Produktionskulturen ist eine Impfmenge von 1:100 der zu beimpfenden Kulturen ausreichend. Die Vorkultur II bzw. III erfolgt zweckmäßigerweise in normalen Rührfermentoren entsprechender Tankgröße. Bezüglich der Belüftung und der Rührintensität ist kein spezifisches Regime erforderlich (siehe Beispiel 2).
Die Hauptkultur (Produktionskultur) erfolgt entweder als diskontinuierliche Kultur (batch-Verfahren) oder vorteilhafter als semikontinuierliche Kultur (fed batch-Verfahren) in normalen konventionellen Rührwerkfermentatoren, die mit Einrichtungen des MSR-Technik für Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration, O_2-Gehalt des Kulturmediums (pO_2) und CO_2-Gehalt der Abluft versehen sind. Die Synthese der Pektatlyase und deren Exkretion in das umgebende Medium wird durch eine spezifische Prozeßführung wesentlich gefördert, wobei die Limitierung des pO_2 und ein optimaler Gehalt an CO_2 des Kulturmediums durch eine bestimmte Regelung des Lufteintrages und der Rührerdrehzahl zu einem bestimmten Zeitpunkt der logarithmischen Wachstumsphase den Hauptfaktor darstellt. Die Art und Weise der Prozeßführung sowie die Zusammensetzung des Kulturmediums ist ein wesentlicher erfindungsgemäßer Bestandteil des Verfahrens zur Erzielung einer hohen und sicher reproduzierbaren Ausbeute an Pektatlyase. Die optimale Inkubationstemperatur beträgt 22,5°C und ist nicht identisch mit derjenigen, die ein maximales Bakterienwachstum und Biomassebildung ermöglicht.
Der Endpunkt der Pektatlyase – Produktionsphase ist durch eine deutliche, schnell erfolgende Veränderung der Parameter pO_2, CO_2-Abluft und bedingt der cH charakterisiert (siehe Beispiel 2, 3 u. 4) und kann als Signal für den Fermentationsabbruch genutzt werden.

Erfindungsgemäß wird durch die Anwendung der semikontinuierlichen Kultur (fed-Batch-Verfahren) eine wesentliche Produktionssteigerung erreicht: Nach einer normalen „Startkultur" werden am Ende der Pektatlyase-Bildungsphase (22–24 Stunden Fermentationsdauer) 0,7 bis 0,8 Volumenanteile der Kulturlösung geerntet und erneut mit frischen sterilisiertem komplexen Kulturmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, wobei ohne erkennbare lag-Phase der Pektatlyasebildung ein starkes Wachstum und Enzymbildung einsetzt (siehe Beispiel 3) und bereits nach 10–12 Std. Fermentation wieder das Maximum an gebildetem Enzym in der Kulturlösung vorhanden ist. Überraschenderweise wird dabei die Pektatlyase-Ausbeute bis mindestens zur 4.–5. Wiederholung von Lauf zu Lauf gesteigert, wobei eine nicht erklärbare Anpassung der Bakterien angenommen werden muß. Damit kann die Gesamtausbeute an Pektatlyase im gleichen Zeitraum gegenüber dem Batch-Verfahren wesentlich gesteigert werden, außerdem entfällt hierbei die Anzucht der Vorkulturen.
Die Aufarbeitung der fermentierten Kulturlösung erfolgt in der bekannten Art und Weise und ist mit keinen besonderen Schwierigkeiten verbunden, da der verwendete Bakterienstamm keine hindernden Schleimsubstanzen bildet und das Hauptenzym Pektatlyase relativ wenig empfindlich gegenüber den angewendeten Aufbereitungsmethoden ist. Durch Zentrifugieren entsteht ein weitgehend klares Kulturfiltrat, welches durch Vakuumkonzentration auf die 10–20fache Konzentration eingeengt werden kann. Dieses Vakuumkonzentrat ist bei Temperaturen von 0 bis 4°C bis zu 12 Monaten ohne größere Verluste an Enzymaktivität haltbar. Wesentliche Vorteile bietet die energiesparende und schonende Einengung des Kulturfiltrates durch eine Ultrafiltration mit Zelluloseazetat-Membranen bis zur Enzymaktivität von 800 U · ml^{-1}, wodurch eine weitgehende Entsalzung und Befreiung von anderen niedermolekularen Stoffen erfolgt. Dieses Ultrafiltrations-Konzentrat läßt sich durch Lyophilisation zu einem nahezu unbegrenzt haltbaren Trockenpräparat verarbeiten. Durch eine Zugabe von in der Lebensmitteltechnologie zugelassenen Enzymstabilisatoren (beispielsweise $NaHCO_3$ + $CaCl_2$) ist das durch Ultrafiltration gewonnene Enzymkonzentrat ebenso gut lagerfähig wie das thermisch eingeengte Enzymkonzentrat.

Ausführungsbeispiele

Methodik
Bestimmung der Enzymaktivität von Pektatlyase:
Einheit [U] = Bildung von 1 µM ungesättigter Oligouronsäure · ml^{-1} · min^{-1} (T = 25°C)
Messung: Zunahme der Extinktion bei 235 nm
(Mol. Extinktionskoeffizient [ε] = 4800)
Substrat: 0,1 % Pektinsäure + 10^{-4} M $CaCl_2$ in 0,1 M
Trispuffer *p*H 8,0
Zusammensetzung der Kulturmedien:

Kulturmedien für Stammkulturen:	Nähragar I	34,000 g
	Pektin (A o. C)	5,000 g
	Kartoffelsaft	300,0 ml
	H_2O	700,0 ml
	cH = *p*H	6,8–7,0
	Sterilisation:	30 min., 105 °C (2×)
Produktionskulturmedium:	$(NH_4)_2HPO_4$	1,800 g
(Komplexmedium)	KNO_3	0,750 g
(PKM E.c X)	$Na_2SO_4 \cdot 1\,OH_2O$	0,200 g
	$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,150 g
	$CaCl_2$ sicc.	0,050 g
	Soja-Extr.-Schrot	15,000 g
	Melasse	15,000 g
	Zuckerrübentrockenschnitzel	3,750 g
	(Erbsen-Samenschalen)	(10,000) g
	Wasser	1 000 ml
	Sterilisation:	20–30 min bei 120 °C
	cH:	nach Sterilisation auf *p*H 7,0–7,1 einstellen

Beispiel 1 Submerskultur und Pektatlyasebildung im Labormaßstab
a) Vorkultur
Der Leistungsstamm wird als „Frostkonserve" in Abschmelzampullenbei −30 bis −35°C aufbewahrt. Das Beimpfen der Vorkultur erfolgt direkt mit diesen oder vorzugsweise nach einer Passage über das Kulturmedium für Stammkulturen in Agar-Schrägröhrchen.
Die Vorkultur I wird als Schüttelkultur mit nachstehenden Parametern angelegt:

Kulturgefäße:	Vorzugsweise Erlenmeyer-Kolben 100 ml oder Langhals-Rundkolben 750 ml
Kulturmedium:	Produktionskulturmedium (25 bzw. 200 ml)
Temperatur:	25 °C
Inkubationsdauer:	20–24 Std.
Bakteriendichte:	$5 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^{10}$ Bakt. · ml^{-1}

b) Hauptkultur

Fermentortyp:	Laborfermentor LF 2 (ZWG Mytron Heiligenstadt)
Nutzvolumen:	3000 ml
Kulturmedium:	Produktionskulturmedium *p*H 7,0
Inokulum:	25 ml Bakteriensuspension von Vorkultur I
Temperatur:	22,5 °C
Belüftung:	30 L Luft · h^{-1}
Rührerdrehzahl:	4 Std. 600, dann 500 rpm
pU_2:	nicht geregelt
Fermentationsdauer:	24 Std.
Verlauf der Fermentation:	siehe Fig. 1
Es bedeuten:	A = Pektatlyase-Aktivität B = 0_2-Gehalt in der Kulturlösung (pO_2) C = CO_2-Gehalt der Abluft D = Wasserstoffionenkonzentration (*p*H)
Kulturfiltrat:	Bei 5000 g 20 min zur Abtrennung der Bakterien und Restbestandteilen des Kulturmediums zentrifugiert.
Farbe:	leicht gelb-bräunlich, ziemlich klar
Geruch:	fast neutral
Pektatlyase-Aktivität:	39,4 U · ml^{-1}

Beispiel 2 Submerskultur und Pektatlyasebildung im halbtechnischen Maßstab

Nach der Optimierung der Zusammensetzung des Kulturmediums und der Prozeßführung des Fermentationsvorganges im Labormaßstab wurde das Verfahren im halbtechnischen Maßstab im 3-m^3-Rührwerksfermentor überprüft.

a) Vorkultur I

Wie im Beispiel 1 beschrieben.

b) Vorkultur II

Fermentor:	Rührwerksfermentor üblicher Bauart und einem Tankgesamtvolumen von 30 L
Nutzvolumen:	20,0 L
Kulturmedium:	Produktionskulturmedium (PKM E.c.X), *p*H 7,0)
Inokulum:	200 ml Bakteriensuspension aus Vorkultur I
Temperatur:	25 °C
Belüftung:	300 L · h^{-1}
Rührerdrehzahl:	300 rpm
Inkubationsdauer:	22 h
Bakteriendichte:	3,5 · 10^9 Bakt. · ml^{-1}
Pektatlyase-Aktivität:	21,3 U · ml^{-1}

c) Hauptkultur

Fermentor:	Rührwerksfermentor herkömmlicher Bauart mit einem Gesamtvolumen von 3 m^3
Nutzvolumen:	2000 L
Kulturmedium:	Produktionskulturmedium (PKM E.c.X) Sterilisation: 30 min 120 °C c*H* = *p*H 7,0
Inokulum:	20 L Bakteriensuspension aus Vorkultur II
Temperatur:	22,5 °C
Belüftung:	25 m^3 Luft · h^{-1} für 5 h, dann 10 cm^3 · h^{-1}
Rührerdrehzahl:	150 rpm für 5 h, dann 100 rpm
pO_2:	nicht geregelt
Fermentationsdauer:	24 Std.
Verlauf der Fermentation:	siehe Fig. 2
Kulturfiltrat:	Die Bakterienmasse und Rest der Nährlösungsbestandteile ließen sich ohne Schwierigkeiten im Seperator abtrennen.
Farbe:	hell gelb-bräunlich, ziemlich klar
Geruch:	fast neutral
Pektatlyase-Aktivität:	43,3 U · ml^{-1}

Beispiel 3 Semikontinuierliche Kultur (Fed-batch-Kultur) im Labormaßstab

Die Eignung der semikontinuierlichen Kultur zur Pektatlyase-Produktion wurde im Laborfermenter LF 2 überprüft. Nach dem Erreichen der stationären Phase der Pektatlyasebildung wurden 75% (2250 ml) der fermentierten Kulturlösung abgelassen und durch die gleiche Menge an frischer steriler Nährlösung (Produktionskulturmedium) ersetzt.

Anlage der Startkultur: wie im Beispiel 1 beschrieben

Temperatur:	22,5 °C
Belüftung:	30 L Luft · h^{-1}
Rührerdrehzahl:	500 rpm

Der Endpunkt der Pektatlyase-Bildung ist durch einen rapiden Abfall des CO_2-Gehaltes der Abluft gekennzeichnet. Der zeitliche Verlauf der Pektatlyasebildung und der jeweilige CO_2-Gehalt der Abluft ist aus der Fig. 3 zu ersehen. Bemerkenswert ist die Zunahme der Pektatlyase-Aktivität in der Kulturlösung nach dem II. und III. Lauf.

Fig. 1

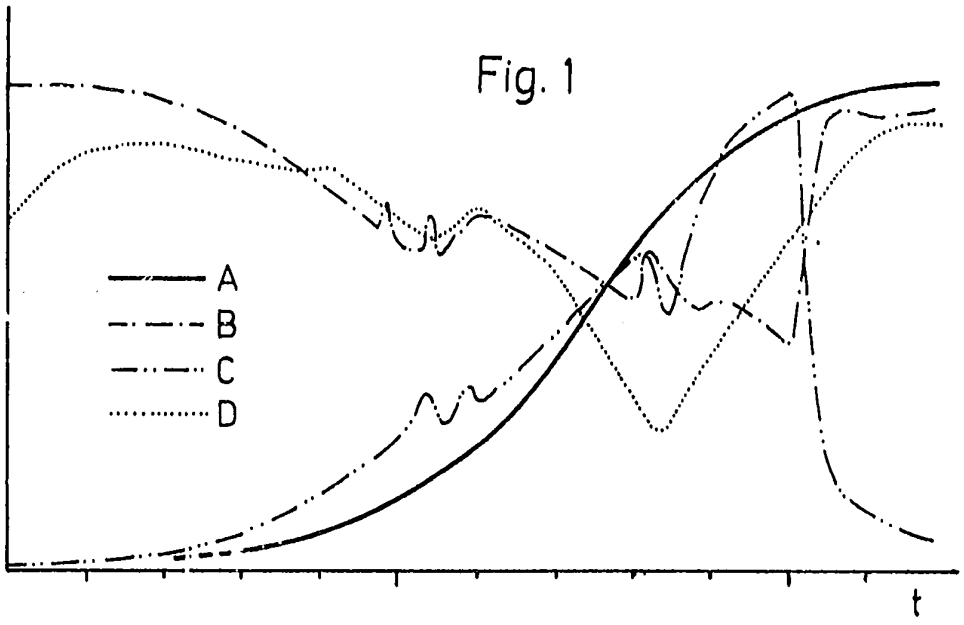


Fig. 2

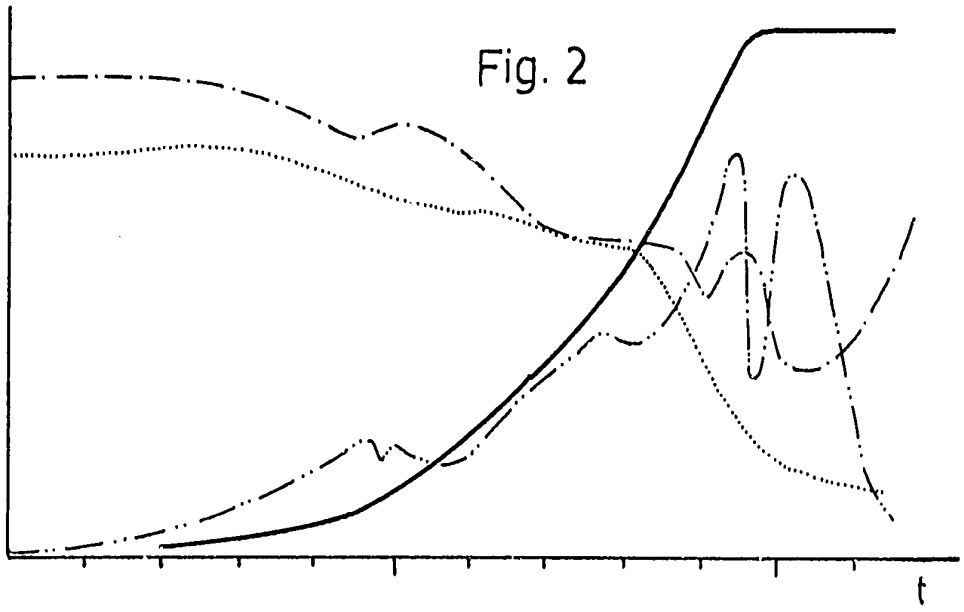


Fig. 3

