

Über die Erreger der "Brotkrankheit". III. Mitteilung, Über die Amylasen aus fadenziehendem Brot isolierter Bacillusstämme

Autor(en): **Streuli, H. / Staub, M.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **46 (1955)**

Heft 4

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983100>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Über die Erreger der „Brotkrankheit“

III. Mitteilung

Über die Amylasen aus fadenziehendem Brot isolierter *Bacillus*-Stämme^{*)}

Von *H. Streuli* und *M. Staub*

(Mitteilung aus dem Kantonalen Laboratorium Zürich)

Kneen und *Beckord*²⁾ haben gefunden, dass aus fadenziehendem Brot isolierte *Subtilis*-Stämme sich in drei Merkmalen von Stämmen anderer Herkunft wesentlich unterscheiden:

1. in der Art ihrer Amylasen,
2. in der Aktivität der α -Amylasen,
3. im Verhalten der Amylasen gegenüber gewissen getreideeigenen Inhibitoren.

Böte sich hier vielleicht eine bestechend einfache Lösung für die Besonderheit der Fadenzieher: Brot, ein selektiver Nährboden!? Vermögen Bakterien mit starken, inhibitor-negativen Amylasen sich bessere Ernährungsbedingungen zu verschaffen, und könnten sie sich dadurch rascher entwickeln? – Nein. Selektion in bezug auf Amylasen liegt sicher nicht vor: keiner der brotfremden Stämme besass Amylasen vom Fadenzieher-Typus! Die Entwicklungsgeschwindigkeit, gemessen am Wachstum des Krankheitsherdes auf Brotscheiben, ist nach unsern Erhebungen von der α -Amylase-Aktivität unabhängig. – Immerhin scheint endlich ein höchst wertvolles empirisches Indiz für Fadenzieher gefunden?

Untersuchungen an unsern eigenen Stämmen (Tabelle 1) konnten die Befunde von *Kneen* und *Beckord* nur teilweise bestätigen:

1. Von 29 aus zersetztem Brot isolierten *Subtilis*-Stämmen reagierten nicht weniger als 15 inhibitor-positiv. Mit der positiven Reaktion verknüpft war, wie Stichproben zeigten, eine hohe Verzuckerungsaktivität.
2. Von den untersuchten zwei Stämmen brotfremder Herkunft besass einer inhibitor-negative α -Amylasen; parallel dazu ging eine niedrige Verzuckerungsaktivität.
3. Alle unsere Fadenzieher zeigten eine hohe α -Amylasen-Aktivität, wenn auch vielfach eine geringere als die Fadenzieher der amerikanischen Forscher.

^{*)} Ausschnitt aus der Dissertation von *H. Streuli*: Zur Kenntnis der «Brotkrankheit» (Universität Zürich 1955).

Tabelle 1
Fermentaktivität auf Kleibouillon

Art	Stamm	pH	Schleimbildung		Amylasen			Proteasen	
			Faden- ziehen	Viskosität 20°	nach Dingle	n. Kneen und Beckord		n. Dingle	
					geklärte Zone	Dextr'szeit f. 10 ml Lösg.	Inhibitor- Reaktion	geklärte Zone	
				H ₂ O = 1	ø mm	Min.		ø mm	
B. subtilis	2 b	7,1	—	1,26	16,4	0,30	—	17,3	
	2 e	7,2	—		20,1 *	8,0	+	14,7	
	3 a	6,8	—	1,1	14,2	2,8	—	17,9	
	3 c	7,2	—	1,3		13	—		
	4 a	7,6	+	1,8	—	13	—	16,7	
	4 c	7,2	—	1,2	13,7	4	—	18,7	
	4 d	7,3	—		*	3,8	+	13,9	
	4 e	6,7	—	1,2	*	4,7	+	14,2	
	4 g	7,2	—	1,7		0,55	—		
	5	7,3	—	1,7	16,6	1,8	—	17,3	
	6 b	7,0	—		—	3,0	—	18,7	
	6 c	7,2	—	2,7		0,7	—		
	6 d	6,8	—		*	1,3	+	13,7	
	7 a	7,6	—		*	13	+	13,2	
	7 b	7,4	—		—	2,8	—	16,7	
	7 c	7,7	—		*	15	+	12,6	
	7 d	7,7	+	1,7		1,5	—		
	9 b	8,0	+	1,6	21,8 *	3,4	+		
	9 e	7,5	—			13,9	0,54	—	17,3
	10	7,7	—	1,8	15,7	0,38	—	20,0	
	11 b	7,3	—		14,7	1,1	—	18,0	
	11 c	7,6	+	1,8	15,1	1,5	—	20,1	
	12 a	7,3	—		17,2 *	5,7	+	13,7	
	12 b	7,4	—	1,2	*	9	+		
	12 c	7,4	—		18,0 *	3,6	+	12,6	
	13 a	7,4	—	1,4	20,5 *	4,2	+	16,8	
	14 b	6,5	—			4,7	—	14,0	
	15 a	7,0	—		17,8 *	7,5	+	14,5	
	16 a		+	2,4	20,0 *	2,4	+	16,4	
	16 b	7,6	—	1,1		12	+		
16 c	7,4	—	1,3	17,1 *	5,5	+	13,3		
17 a	7,3	—			5,5	+			
17 b	7,0	—		17,7 *	5,5	+	13,3		
18 a	7,2	—	1,5		> 11 h	+			
X.43	8,4	—	1,1		12	+			
X.52	7,6	—	1,1		14	+			
2594	7,8	—	1,1	18,8 *	18	+	12,6		
43 A1		—	1,2		> 11 h				
43 B1	8,1	—	1,1		13	+			

*siehe Text

(Fortsetzung von Tabelle 1 siehe folgende Seite)

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Art	Stamm	pH	Schleimbildung		Amylasen			Proteasen
			Fadenziehen	Viskosität 20°	nach Dingle	n. Kneen und Beckord		n. Dingle
					geklärte Zone	Dextrzeit f. 10 ml Lösg.	Inhibitor-Reaktion	geklärte Zone
	3 e	6,8	—	H ₂ O = 1 1,1	ø mm	Min. 29	+	ø mm
<i>B. licheniformis</i>	6 a	6,8	—		—	155		17,3
	11 a	6,9	—		12,0	125	—	18,7
	14 a	7,0	—	1,3		> 11 h		
	15 b	7,2	—	1,2	—	140	—	18,9
	18 b	6,8	—		—	96	—	
	B X.53	6,6 7,2	— —	1,1 1,2	15,1	90 21	— +	18,9
<i>B. cereus</i>	9 a	5,3	—	1,2	0	> 11 h		0
	13 b	6,8	—	1,3		> 11 h		
	A 5	5,8	—			> 11 h		
<i>B. mega</i>	pain fil. 5222	5,8	—	1,4		> 11 h		
		5,4	—					

Die Inkongruenz der beidseitigen Befunde ist rätselhaft. Sollten die geringfügigen Unterschiede in der Versuchstechnik dafür verantwortlich gemacht werden?

Fest steht, dass sich die Vertreter der Art *B. subtilis* nach ihren Amylasen scharf in zwei Gruppen scheiden lassen. Eine eindeutige Beziehung zwischen der inhibitor-negativen, schwach verzuckernden Gruppe und der Flora fadenziehenden Brotes muss aber nach unseren Ergebnissen verneint werden.

Dagegen ist eine Verknüpfung von Amylasentypus und echten Fadenziehern unverkennbar: Sämtliche inhibitor-negativen Stämme ohne Ausnahme vermochten Brot fadenziehend zu machen, wogegen die inhibitor-positiven Stämme mehrheitlich versagten (Tabelle 2).

Tabelle 2
Zusammenhang zwischen Inhibitor-Reaktion und Fadenziehen

	In Semmeln geimpft Stämme	Semmel fadenziehend	Semmel nicht fadenziehend
B. subtilis inhibitor-positiv	17	6	11
inhibitor-negativ	11	11	0
B. licheniformis inhibitor-positiv	1 (1)	1 (0)	0 (1)
inhibitor-negativ	4 (4)	4 (1)	0 (3)

In Klammern die Resultate, welche an Brotscheiben statt an Semmeln gewonnen wurden. Vgl. I. Mitteilung.
Bei *B. subtilis* bestätigen die Scheibenversuche die Semmelversuche

Anmerkung:

Man beachte, dass die Amylase-Aktivität nach *Dingle et al.* nicht parallel den nach *Kneen* und *Beckord* erhaltenen Werten verläuft. Bei der Bestimmung nach *Dingle* zeigt nur ein Teil der Stämme einen von der blaufarbenen Umgebung deutlich abgegrenzten – von einem rotvioletten Kreisring umgebenen (in der Tabelle 1 durch ein Sternchen * gekennzeichnet) – weissen Hof; bei den übrigen Stämmen war der Übergang zwischen weiss und blau ausgesprochen unscharf und verlief niemals über rötliche Zwischentöne. Die Stämme der ersten Gruppe reagierten ausnahmslos inhibitor-positiv, die der zweiten Gruppe ausnahmslos inhibitor-negativ.

Die Assoziation von rotviolettem Kreisring und Inhibitor-Reaktion mit β -Amylasen liegt auf der Hand.

Nach *Peltier* und *Schroeder*³⁾ zeigen unter den *Bb. subtiles* die Stämme von α -Amylasen-Typus die stärkste proteolytische Aktivität. Unsere Ergebnisse bestätigen diesen Befund (Tabelle 1).

Dieselben Autoren fanden des weitern, dass aus fadenziehendem Brot isolierte Organismen auf Kleie-Bouillon pH-Werte über 8,0 erzeugen. Unsere Werte liegen durchwegs niedriger, wofür die schwach unterschiedlichen Arbeitsbedingungen mitverantwortlich sein mögen.

Experimentelles

Vorgehen

Kleiebouillon, zu je 100 ml in Glasdosen verteilt (Schichthöhe 2,5–2,8 cm) wurde mit 20-Stunden-alten Kleie-Schrägagarkulturen der zu untersuchenden Organismen massiv beimpft und vier Tage bei 35° bebrütet. Hernach filtrierte man durch Glaswolle und schleuderte das Filtrat scharf aus. Das Zentrifugat wurde bei 0° aufbewahrt und für folgende Untersuchungen verwendet:

Untersuchungen der Amylasen

a) Nach *Kneen* und *Beckord* ²⁾:

Bestimmung der Alpha-Amylase-Aktivität durch Messung der Dextrinierungszeit von 1 %iger Stärke, mit und ohne Inhibitor.

Vorgehen: loc. cit.

Unser Inhibitor wurde aus Weizenmehl isoliert, wobei der wässrige Extrakt durch Vakuumdestillation unter Zusatz von GE Antifoam 81066, statt durch Verdunsten über Nacht eingeeignet wurde.

Die Prüfung auf Inhibition haben wir geringfügig abgeändert: Ergänze ein berechnetes Volumen (max. 9 ml, Dextrinierungszeit min. 15 Min.) der zentrifugierten Kulturflüssigkeit mit Wasser zu 9 ml, versetze mit 1 ml Inhibitor-Lösung; gib nach genau 5 Minuten 20 ml Stärkelösung von 30° zu und bestimme die Dextrinierungszeit wie üblich. – Inhibitor-Lösung: 75 mg des Inhibitors mit dest. Wasser und einigen Tropfen Alkohols ad 25 ml. Kontrolle der Wirksamkeit an filtriertem Speichel.

Zur Bestimmung der Verzuckerungs-Aktivität haben wir in Ermangelung des von *Kneen* und *Beckord* verwendeten Gerätes mit Bleiringen beschwerte 100-ml-Weithals-Erlenmeyer, mit doppelt durchbohrtem Gummistopfen samt aufgesetztem Manometer und zu grober Kapillare ausgezogenem rechtwinklig gebogenem, kurzschenkligen Glasrohr, verwendet. Nach Einstellen ins Bad und Druckausgleich Abschmelzen der Kapillaren. – Bei den inhibitor-positiven Amylasen muss der Stopfen mit Draht befestigt werden.

b) nach *Dingle et al.* ¹⁾:

Cup plate assay. Mass der Amylase-Aktivität ist der Durchmesser der geklärten Zone auf Stärkeagar.

Vorgehen: loc. cit. Agar in Petrischalen; Tripelbestimmung, auf drei verschiedene Schalen verteilt. Der Durchmesser unserer cups betrug 9 mm; Füllung 0,15 ml. Bebrütung 18 Stunden bei 37°. Entwickeln der Zonen durch Übergießen mit verdünnter Jodlösung.

Bestimmung der Proteasen-Aktivität

Nach *Dingle et al.* mittels cup plate assay. Vorgehen wie bei der Amylasenbestimmung. Entwickeln der hydrolysierten Zone durch Übergießen mit Kalomel in Salzsäure; siehe *Smith et al.* ⁴⁾. Mass der Proteasen-Aktivität ist der Durchmesser der geklärten Zone.

Da uns nur die relativen Werte interessieren, verzichteten wir auf Eichung der Methode mittels Normal-Protease.

Nährböden

KLEIEBOUILLON

Bereite einen wässrigen Kleie-Extrakt durch Autoklavieren von 5 Teilen Kleie : 100 Teilen Wasser während 20 Minuten bei 115°; kolriere. Löse zu 1 Liter dieses Extraktes 10 g Pepton, 0,54 g K₂HPO₄ und 0,3 g KH₂PO₄. Verteile und sterilisiere während 20 Minuten bei 120°. pH 6,0. (Nach *Kneen* und *Beckord* ²⁾).

KLEIEAGAR

Kleiebouillon mit 2 % Agar.

AGAR FÜR CUP PLATE ASSAY DER AMYLASEN UND PROTEASEN

Zu 800 ml 5 %igem wässrigem sterilisiertem Agar mit 0,025 % Salicylaldehyd gib 200 ml (inkl. Wasser zum Nachspülen) einer Lösung von 10 g Stärke bzw. Gelatine. Stelle auf pH 4,5 ein, verdünne mit 1 Liter warmem doppelt konzentriertem McIlvaine-Puffer (pH 4,5), verteile zu je 25 ml auf Reagenzgläser (vgl. Dingle *et al.*¹⁾) und verschliese mit Watte. Im Eisschrank aufbewahren.

Ergebnisse

Siehe Tabelle 1.

Zusammenfassung

1. Die Amylasen aus fadenziehendem Brot isolierter *Bacillus*-Stämme verhalten sich weder nach Natur noch nach Aktivität einheitlich. Starke Amylasen besitzt allein *B. subtilis*, die *Bb. licheniformis*, *cereus* und *megaterium* zeigen schwache oder keine Amylasen-Aktivität.
2. Es wird bestätigt, dass sich die Vertreter der Art *B. subtilis* nach ihren Amylasen scharf in zwei Gruppen scheiden lassen. Entgegen frühern Befunden muss aber eine eindeutige Beziehung zwischen der inhibitor-negativen, schwach-verzuckernden Gruppe und der Flora fadenziehenden Brotes verneint werden.
3. Die Fähigkeit, auf Brot Fäden zu erzeugen, ist bei *B. subtilis* in undurchsichtiger Weise korreliert mit der Fähigkeit, bestimmte Amylasen zu produzieren.

Résumé

1. Les analyses provenant de souches de bacilles rencontrées dans le pain filant ont un comportement variable quant à leur nature et leur activité. Seul le *B. subtilis* possède de fortes amylases. Quant aux *Bb. licheniformis*, *cereus* et *megaterium*, leur activité amyliasique est faible ou nulle.
2. On a confirmé que les représentants de l'espèce *B. subtilis* se laissent nettement séparer en 2 groupes sur la base de leurs amylases. A l'encontre d'observations antérieures, on n'a pas pu démontrer de relation nette entre le groupe inhibiteur-négatif, à faible pouvoir saccharifiant et la flore du pain filant.
3. L'aptitude à rendre le pain filant est, chez *B. subtilis* en relation non éclaircie avec sa capacité de produire des amylases déterminées.

Summary

It has been found that *B. subtilis*, an agent of the ropiness of bread, contains strong amylases. There is a relation between these amylases and the ability of *B. subtilis* to cause ropiness. *Bacillus licheniformis*, *B. cereus* and *B. megaterium* have a weak or no amylase activity.

Literatur

- 1) Dingle S., Reid W. W. und Solomons G. L., J. Sci. Fd Agric. **4**, 149 (1953)
- 2) Kneen E. und Beckord L. D., Arch. Biochem. **10**, 41 (1946)
- 3) Peltier G. L. und Schroeder F. R., J. Bact. **57**, 127 (1949)
- 4) Smith N. R., Gordon Ruth E. und Clark F., Aerobic Mesophilic Sporeforming Bacteria. Misc. Publ. No. 559, U. S. Dept. of Agric. 1946 und 1953.