

(Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie der König Alexander-Universität  
in Ljubljana.)

## Gewinnung des Enzyms von *Bacillus macerans* und seine Wirkungsweise.

Von  
M. Blinc.

(Nach Versuchen von A. Mravljak u. J. Počkar.)

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. April 1941.)

Die Stärkechemie greift immer wieder auf die merkwürdigen Vorgänge zurück, die an den Stärkekleistern unter dem Einfluß des von *F. Schardinger*<sup>1</sup> gezüchteten *Bacillus macerans* ablaufen und schließlich zu den interessanten, schön kristallisierenden zyklischen Dextrinen führen. Man hat es hierbei jedenfalls mit einer Spaltung glucosidischer Bindungen zu tun und mit Ringschlüssen an fünf- oder sechsgliedrigen Bruchstücken der Stärke. Ob an diesen heterogenen Vorgängen ein Enzym oder mehrere Enzyme beteiligt sind, ist eine außerordentlich wichtige Frage, die auch am hiesigen chemischen Institut längere Zeit bearbeitet wird. Solange man die Stärkespaltung mit einem lebenden Mikroorganismus durchzuführen gezwungen ist, kann von guten kinetischen Messungen keine Rede sein. Aus diesem Grunde arbeiteten wir schon längere Zeit daran, aus den Substraten, in denen der genannte *Bacillus* gewachsen ist, mikrobefreie Lösungen zu gewinnen und ihren Enzymgehalt zu definieren.

Inzwischen sind zwei Arbeiten erschienen, die der gleichen Frage gewidmet sind; sie veranlassen uns auch, unsere diesbezüglichen Erfahrungen mitzuteilen. *E. B. Tilden* und *C. S. Hudson*<sup>2</sup> stellten fest, daß man aus Kulturen von *Bacillus macerans*, die bei 38° C auf Kartoffelmedien gewachsen sind, mittels Filtration durch ein *Berkefeld-N*-Filter eine Enzymlösung gewinnen kann, welche die *Schardinger*-Dextrine schnell und in größeren Mengen liefert, als dies bis zur Zeit möglich war. Sie beobachteten hierbei zwar keine Veränderung im Reduktionsvermögen und in der optischen Drehung, wohl aber war es möglich, den Reaktionsverlauf durch Viskositätsmessungen zu verfolgen.

Veranlaßt durch diese Mitteilung berichteten *K. Freudenberg*, *E. Schaaf*, *G. Dumpert* und *T. Plaetz*<sup>3</sup>, daß auch sie in bakterienfreien Ultrafiltraten

<sup>1</sup> *F. Schardinger*, Wiener klin. Wochenschr. 1904, S. 8; Centralbl. f. Bakt. II, 14, 772, 1905; 19, 161, 1907; 22, 98, 1909; 29, 188, 1911. —

<sup>2</sup> *E. B. Tilden* u. *C. S. Hudson*, J. Amer. Chem. Soc. 61, 2900, 1939. —

<sup>3</sup> *K. Freudenberg*, *E. Schaaf*, *G. Dumpert* u. *T. Plaetz*, Naturwiss. 27, 850, 1939.

von Hefewasserkulturen des *Bacillus macerans* die Fähigkeit zur Bildung von *Schardinger*-Dextrinen aus Stärke beobachtet haben.

Näheres über die Kulturbedingungen des *Bacillus macerans*, welche die Gewinnung guter enzymreicher und vor allem vergleichbarer Enzymlösungen ermöglichen sollen, findet man in diesen Arbeiten nicht. Genaue Angaben sind darüber bei der bekannten Neigung des *Bacillus macerans* zur Degeneration besonders deswegen wichtig, weil auch nach Erfahrungen am hiesigen Institut in solchen Fällen die relative Menge der kristallisierten Dextrine abnimmt, dafür aber reichlich die wenig willkommenen gummösen Produkte auftreten. Diese Lücke soll durch die vorliegende Arbeit ausgefüllt werden, in welcher wir uns an *F. Schardinger* und *K. Freudenberg* anschließen.

*F. Schardinger* fand bekanntlich seinen sogenannten Rottebazillus als zufällige Verunreinigung in einem Kartoffelnährgemisch und beobachtete ihn später auch im Schlamm von Flachsrostgruben. Der Pilz bildet bewegliche einzelne oder in Verbänden angeordnete Stäbchen, die bei Sporenbildung und nach der Reifung zur Ruhe kommen. Die Sporen sind nach seinen Angaben sehr widerstandsfähig und können erst nach 3stündigem Kochen vernichtet werden. Als Wachstumsgrenzen gibt *Schardinger* 15 bis 40° C an. Säuregehalt hemmt das Wachstum. Als Substrat bewährten sich besonders gut gekochte Kartoffel- und Möhrenrübenzylinder; sie zerfallen zu einem wässrigen Brei. Charakteristisch ist das Wachstum auf rohen Kartoffelkeilen (mit Kreidezusatz), die sich meistens braun bis braunschwarz färben und in sich zusammenfallen. Man beobachtet dabei reichlich Gasentwicklung und auf stärkehaltigen Nährsubstraten Bildung von *Aceton*.

Zur Isolierung dieses interessanten Spaltproduktes impfte er größere Mengen einer Bouillonkultur auf gekochten sterilen Kartoffelbrei mit Kreidezusatz bei 37° C und ließ den Vorgang bei dieser Temperatur ablaufen. Je nach der Menge des übertragenen Impfmateriells bildete sich nach 24 bis 36 Stunden auf der Oberfläche eine Schaumdecke aus und gleichzeitig machte sich ein angenehmer Geruch nach Obst bzw. Aceton bemerkbar. Nach 4 Tagen ließ die Gärung nach. Zu dieser Zeit stellte *Schardinger* die Kulturen ab, um sie zur Acetongewinnung zu verarbeiten.

Zur Gewinnung der *Dextrine* empfahl *F. Schardinger* das Substrat auf 40° C zu erwärmen und nach der Impfung bei 46 bis 48° C zu halten. Kartoffelstärkekleister wurde nach 3 bis 4 Stunden leichter beweglich, in 10 bis 12 Stunden löste er sich zu einer opalisierenden Flüssigkeit, wobei Gasbildung, Schäumen und Geruch nach Aceton auftrat. Nach 6 bis 8 Tagen war der Vorgang beendet. Um kräftige Kulturen zur Hand zu haben, empfahlen *K. Freudenberg* und *R. Jakobi*<sup>1</sup> den Bacillus bei 40° C in folgendem Turnus zu ziehen:

- 10 Tage Fleischbrühe,
- 10 Tage Kartoffelbrei mit Kreide,
- 10 Tage Kartoffelkeile,
- 10 Tage Fleischbrühe,
- 10 Tage Kartoffelbrei mit Kreide,

wonach man die Reihenfolge in obiger Anordnung fortsetzt.

<sup>1</sup> *K. Freudenberg* u. *R. Jakobi*, Liebigs Ann. 518, 103, 1935.

Die Erfahrungen, über die wir hier berichten, erstrecken sich über 14 Monate. In diesem Zeitraum hielten wir den *Bacillus*<sup>1</sup> in kontinuierlicher Arbeit nach *K. Freudenberg* je 10 Tage in 30 ccm-Kölbchen auf Bouillonwasser, Kartoffelbrei mit Kreidezusatz und auf Kartoffelkeilen mit Kreidezusatz bei 37° C. Begleitbakterien konnten nach etlichen Überimpfungen leicht entfernt werden, worauf reine *Macerans*-Kulturen dauernd erhalten blieben. Parallel mit der genannten Reihenfolge der Nährböden zogen wir den *Bacillus macerans* auf Peptonwasser bei 37° C. Dasselbst zeigten sich größtenteils längliche, stäbchenartige Zellen, die nur wenig Sporen bildeten; Trübung trat nach 1–2 Tagen ein. In diesem Substrat schwächte der *Bacillus* im Verlauf der Zeit ab (langsame Zellenbildung und langsame Trübung des Nährbodens).

Auf Bouillon wuchs der Pilz zu schöner Form heran und erreichte hier seine maximale Zellenlänge, wenn auch das Wachstum zahlenmäßig nicht gerade üppig war. Deutliche Trübung trat nach 10 bis 12 Stunden ein. Besonders gut gelang die Zucht auf Kartoffelbrei. Dieser Nährboden war mit unzähligen sporenhaltigen Zellen und freien Sporen durchsetzt. Die Löffelform war deutlich ausgeprägt; die Größe der Sporen schwankte um die Werte  $1\frac{1}{2}:2\mu$ , Gärung sowie Acetongeruch stellten sich nach 24 Stunden mit Gewißheit ein. Auf den Kartoffelkeilen wuchs der *Bacillus* mit feuchtglänzender, gelblicher Farbe, die Kartoffelmasse wurde breiig.

Bei Beginn der Versuchsserie entwickelte sich der *Bacillus* sehr träge. Wir impften daher vorerst größere Mengen (3–5 ccm der Impfkultur oder einen ganzen Kartoffelkeil). Nach dem zehnten Arbeitsgang war der Stamm soweit gekräftigt, daß wir mit den üblichen Impfmengen (mehrere Platinösen bzw. einige Einstechungen des Keiles) gut auskamen. Die Impfungen sowie die Nummer der Generation wurden fortlaufend vermerkt.

Da das gewonnene Enzym am besten viskosimetrisch charakterisiert wird, kontrollierten wir auch die jeweils erhaltenen Reinkulturen des *Bacillus* selbst auf sein Verflüssigungsvermögen für Stärkekleister. Hierzu wurden 15 ccm einer 2%igen, eine halbe Stunde auf 120° C erhitzten Lösung von Kartoffelstärke in kleinen Erlenmeyer-Fläschchen mit dem *Bacillus* geimpft und der Verlauf der Viskosität verfolgt. Für die orientierenden Versuche diente hierfür eine gewöhnliche Glaspipette, deren Ausflußzeit für Wasser  $t = 7''$  betrug. Bei Impfen in nur zimmerwarme Stärkelösung und erst nachfolgendem Erwärmen auf 37° C war die Entwicklung des *Bacillus* schlecht und die Verflüssigungszeit praktisch zu lang. Gute Erfolge erzielten wir hin-

---

<sup>1</sup> Eine Kultur des *Bacillus macerans* erhielten wir aus dem Institut für Gärungsgewerbe u. Stärkefabrikation in Berlin, dem wir für die freundliche Überlassung bestens danken.

gegen auch ohne Zusatz irgendwelcher Nährsalze, wenn wir die Stärkelösung bei 40° C mit mehreren Platinösen beimpften und bei 45° C stehenließen. Nach 48 Stunden trat Gasentwicklung auf, und nach 5—7 Tagen war die Viskosität der Stärkelösung auf den Wert einer Kristalloidlösung abgesunken. Die Probe wurde fast klar; schwach gelbe Opaleszenz und etwas Bodensatz machten sich bemerkbar. Häufig kristallisierte ein Teil der Dextrine unmittelbar in Form der bekannten Blättchen und Nadeln aus.

Wir verwendeten als Substrat teils käufliche, teils nach *Lafar* selbstbereitete Kartoffelstärke. Erstere wurde mit  $K_2CO_3$  gegen Phenolphthalein neutralisiert. In diesem Falle trat während der Bacilluswirkung ein etwas ammoniakalischer oder hefeartig säuerlicher Geruch auf, bei selbstbereiteter Kartoffelstärke nur deutlicher Acetongeruch. Weil anfangs die Verflüssigung der Kartoffelstärkelösung nur sehr langsam erfolgte, versuchten wir durch Zusatz von Nährsalzen die Lebensbedingungen des Bacillus zu verbessern. Wir hatten hierbei zwar Erfolg, doch unterließen wir, sobald das Bakterium genug gekräftigt war, die Salzzugabe, da die Stärke durch Salze vielfach in ihrer Zustandsform beeinflußt wird.

Nach dreimaligem Wiederholen des *Freudenbergschen* Turnus schien ein Optimum der Virulenz erreicht zu sein. Von der 10. Generation an wurde daher mit der Zucht auf größeren Substratmengen und mit der Gewinnung des Enzyms begonnen. Je 300 ccm Bouillon, Peptonwasser, Hefewasser oder Kartoffelbrei wurden bei 40° C mit einigen Platinösen einer *Macerans*-Kultur aus dem *Freudenbergschen* Turnus geimpft und bei 45° C gehalten.

Von der 17. Generation an begann die Virulenz nachzulassen. Es empfiehlt sich nach dieser Lebensdauer den *Freudenbergschen* Turnus zu unterbrechen und den Bacillus vorübergehend auf anderen für ihn günstigen Nährmedien (rohe Kartoffel z. B.) leben zu lassen und wieder reinzuziehen.

Der Nährboden, aus dem *Bacillus macerans* auf die zur Zucht im großen verwendeten Nährböden überimpft wurde, ist bei genügend kräftigen Stämmen für das Gelingen der Großzucht ohne Bedeutung.

#### *Gewinnung des Enzyms.*

Für die im Großen durchgeführten Versuche erwies sich an erster Stelle wiederum Kartoffelbrei günstig. Bei Verwendung von Hefewasser muß man besonders vor Infektionen auf der Hut sein, da sich der Bacillus auf diesem Substrat nur langsam vermehrt, während er auf Kartoffelbrei so üppig wächst, daß infolge der starken und schnell stattfindenden Vermehrung Verunreinigungen nur selten hinzutreten.

Um den Zeitpunkt festzustellen, zu dem die Enzymaktivität in der Kulturflüssigkeit die größte ist, haben wir aus einem größeren Kulturgefäß nach 7 und 14 Tagen Proben entnommen und sie unter vollkommen vergleichbaren Versuchsbedingungen auf das Enzym verarbeitet<sup>1</sup>. Nach Tabelle I ist bei längerer Kulturdauer wohl der Trockengehalt des Ultrafiltrats gewachsen, die Enzymmenge aber ist wesentlich kleiner geworden. Es ist aber andererseits auch nicht empfehlenswert, die Kulturen früher abzustellen, bevor die Gärung zu einem gewissen Stillstande gekommen ist.

Tabelle I.

300 ccm 10 %-Kartoffelbrei mit Kreidezusatz bei 45° C vergoren; Zentrifugate nach 12stündigem Stehen im Frigidair filtriert. Ultrafiltrate ohne Toluolzusatz untersucht. Aktivität gemessen nach 7, 14 und 21 Tagen.

Dauer der Kultur :	7 Tage	14 Tage
Trockengehalt des Ultrafiltrates . . . . .	5,8 %	10,3 %
Amylaseeinheiten,* „V“ bez. auf Volumen ..	0,018	0,0072
Amylaseeinheiten, „V“ bez. auf Trockengehalt*	0,312	0,069

\* Siehe S. 189.

Zur Enzymgewinnung schüttelten wir den Inhalt der Gärkolben gut durch, zentrifugierten darauf in mehreren Proben 20 Minuten (Tourenzahl = 1500 Sekunden), dekantierten die obere flüssigere Phase ab. In einigen Versuchen wurde sie gleich weiter bearbeitet, bei anderen setzten wir bis zur weiteren Verarbeitung Toluol zu, bei anderen ließen wir sie ausfrieren.

Tabelle II. Einfluß der Vorbehandlung des bakterienhaltigen Zentrifugates auf die Aktivität.

Zentrifugat unmittelbar ultrafiltriert . . . . .	0,017 bez. auf Volumen
Zentrifugat nach 24stündigem Stehen unter Toluol ultrafiltriert . . . . .	0,016 „ „ „
Zentrifugat eingefroren und aufgetaut, dann ultrafiltriert . . . . .	0,014 „ „ „

Da das Toluol als Bakteriengift wirkt und beim Ausfrieren die Bakterienzellen zertrümmert werden, wäre unter Umständen zu erwarten gewesen, daß bei solchen Vorbehandlungen die Menge des Enzyms in der Lösung steigen würde. Nach Tabelle II ist dies jedoch nicht der Fall. Sowohl das Toluol als auch das Ausfrieren fördern nämlich die Ausscheidung der kristallisierten Dextrine und diese reißen womöglich

<sup>1</sup> Die mikroskopische Untersuchung ergab in einzelnen Fällen der Kartoffelbreikulturen schön entwickelte Kristalle in Form von Prismen und Sechsecken, die wohl mit den *Schardinger*-Dextrinen identisch sein dürften.

Teile des Enzyms aus der Lösung mit. Sicher ist es ferner, daß in Fällen, wo die gummösen Dextrine auftreten, die Ultrafiltrate eine geringere Enzymaktivität aufweisen.

Die auszentrifugierte Flüssigkeit wurde filtriert. Nach Überprüfung der Chamberlandkerzen und verschiedener Kollodiumsäckchen entschlossen wir uns für die Druckfiltration durch die *Haenschen* Membranfilter „feinporig“. Bei Gebrauch von neuen Filtern lief die Filtration in 2–3 Stunden gut ab, bei gebrauchten Filtern nahm sie mehrere Stunden in Anspruch und hing auch von dem mehr oder weniger gummiartigen Charakter der Zentrifugate ab. Die Hefewasserzentrifugate werden wegen des heftigen Schäumens vorteilhafter mit Überdruck anstatt mit Vakuum filtriert.

Die Filtrate waren meist sogleich rein und nahezu klar. Nötigenfalls wurde nochmals filtriert. Sie wurden mikroskopisch und durch Impfen auf Kartoffelbrei auf verlässliche Abwesenheit der Bacilluskeime geprüft. Wenn die sofortige Weiterbenutzung der Enzymlösung nicht möglich war, wurde sie mit Toluol überschichtet und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Auch hier fördert die Anwesenheit von Toluol besonders bei höheren Konzentrationen die Abscheidung der Dextrinkristalle. Da diese, wie erwähnt, scheinbar einen Teil des Enzyms mitreißen, nimmt die Aktivität der Lösung etwas ab.

#### *Charakterisierung des Enzyms.*

In den jeweils erhaltenen Ultrafiltraten bestimmten wir den Gehalt an Trockensubstanz, den Wasserstoffexponenten mit der Chinhidronelektrode und das Verflüssigungsvermögen für Stärkekleister. Die Filtrate der Kartoffelbreikulturen sind relativ substanzreich; die Konzentrationen liegen meist zwischen 4,7–6,3%, erreichten aber in Einzelfällen auch bis zu 9%. Das Gros der gelösten Substanz sind Dextrine, welche bei den höheren Konzentrationen beim Stehen besonders unter Toluol auskristallisieren. Die Filtrate der Hefewasserkulturen haben nur um 0,5% Trockensubstanz, eine Kristallisation findet daselbst nicht statt. Die  $p_H$ -Werte betragen in den Filtraten aus Kartoffelbreikulturen 5,15–5,83, aus dem Hefewasser 6,73–7,64. In diesen Grenzen konnte ein besonderer Einfluß des  $p_H$  auf die Aktivität der Filtrate nicht festgestellt werden.

Die Verflüssigungsversuche wurden im Viskosimeter von *Parlow*<sup>1</sup> ausgeführt, wobei uns im Anschluß an *J. Blom*, *A. Bak*, *B. Braae*<sup>2</sup> eine 50%ige Saccharoselösung als Bezugslösung diente. Wir ließen auf je 100 g 3%igem Kartoffelstärkekleister ( $1/2$  Stunde bei 120° C

<sup>1</sup> *Parlow*, Zeitschr. f. Spir.-Ind. 53, 14, 1930. — <sup>2</sup> *J. Blom*, *A. Bak*, *B. Braae*, Zeitschr. physiol. Chem. 250, 103, 1937.

gekocht) 10 ccm der Enzymlösung bei der gewünschten Temperatur einwirken. Nach bestimmten Zeitpunkten nahmen wir die für die Messung notwendige Menge (etwa 80 ccm) des Reaktionsgemisches zur Viskositätsbestimmung ab und wiederholten diesen Vorgang solange, bis der Viskositätswert des Reaktionsgemisches unter den Viskositätswert der Vergleichslösung fiel. Nun wurde graphisch die genaue Zeit ermittelt, die notwendig war, um die Viskosität des Kleisters auf die Viskosität der Vergleichslösung zu drücken (Abb. 1).

Dieser hier als Verflüssigungszeit  $t$  berechnete Faktor ist eine gute Charakteristik der Enzymaktivität. Man kann mit ihr nach der von *Blom*, *Bak* und *Braae*<sup>1</sup> angegebenen Formel

$$V = \frac{1000}{t \cdot \text{vgr. Enzym}}$$

die Aktivität in Viskositätsamylaseeinheiten ( $V$ ) ausdrücken.

Fürs erste genügte uns ein zahlenmäßiger Vergleich der Aktivität im gegebenen Volumen der Enzymlösung; deshalb rechneten wir die Amylaseeinheiten unter Berücksichtigung des Volumens der benutzten Enzymlösung. Da deren Trockengehalt bekannt ist, läßt sich  $V$  (Amylaseeinheit) auch in bezug auf die beteiligte Gewichtsmenge der ultrafiltrierten Substanz berechnen, wobei man natürlich im Auge behalten muß, daß das Enzym nur einen kleinen Bruchteil der Trockensubstanz ausmacht. Für die Beurteilung des Vorganges ist auch diese Zahl wertvoll.

Auf diese Weise überprüften wir den Einfluß der Temperatur auf die Aktivität des Enzyms. Das Optimum liegt bei 55° C. Setzt man die Aktivität bei dieser Temperatur gleich 1, so ist die Aktivität bei:

$$45^{\circ} \text{ C} = 0,90, \quad 65^{\circ} \text{ C} = 0,95, \quad 80^{\circ} \text{ C} = 0,69.$$

Durch Alkohol der Endkonzentration von 80–90 % wird ein Teil der Substanz gefällt; das Enzym fällt und geht beim Lösen des Koagulum aktiv wieder in Lösung.

#### *Wirkungsweise des Enzyms.*

*Tilden* und *Hudson*<sup>2</sup> berichteten, daß die Amylase von *B. macerans* vor allem die innere Reibung der Stärkelösungen drückt. Diese Beobachtung können wir bestätigen. Sie hat diese Wirkung mit den Dextrinogen-amylasen gemeinsam. Sehr wichtig für die weitere Forschung

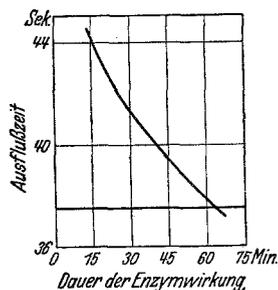


Abb. 1. Berechnung der Verflüssigungszeit  $T$ .

<sup>1</sup> *J. Blom, A. Bak u. B. Braae, Zeitschr. f. physiol. Chem.* **250**, 103, 1937.  
— <sup>2</sup> Siehe S. 183.

ist aber unsere Feststellung, daß bei Amylosen als Substrat während der Wirkung des Enzyms von *B. macerans* die optische Drehung in jener Reaktionsphase, in welcher der Viskositätssturz erfolgt, zunächst ziemlich ansteigt, dann allmählich absinkt, um schließlich fast auf dem ursprünglichen Wert konstant zu bleiben (Abb. 2). Fast gleichlaufend mit der Drehungsänderung steigt auch das Reduktionsvermögen des Reaktionsgemisches vorübergehend an und sinkt dann ab. Man könnte diesen merkwürdigen Gang durch die Annahme deuten, daß das Enzym von *B. macerans* ein  $\alpha$ -Enzym ist und die Spaltungsstücke in der hoch-

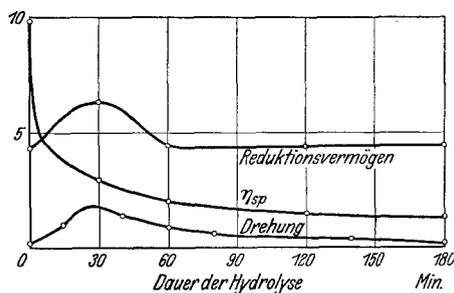


Abb. 2. Hydrolyse der Amylosen mit dem *Macerans*-Enzym.

100 ccm 0,5 %iges Amylosenol + 3,8 ccm Enzymlösung, entsprechend 0,0069 Amylaseeinheiten. Temperatur 55° C. 1 Teilstrich auf der Ordinate bedeutet bei der spezifischen Viskosität  $\eta_{sp} = 0,1$ , beim Reduktionsvermögen 0,1 ccm n/20 Thiosulfat, bei der optischen Drehung 0,1° abgelesenen Winkel im 20 cm-Rohr bei 55° C.

drehenden Form entstehen läßt, deren Überwiegen dann, sei es infolge Bildung von Gleichgewichtsprodukten, sei es durch Ringschlüsse, schwindet, welche im Nachlassen des Reduktionsvermögens angedeutet sind.

In Amylosenolen beobachtet man nach Stillstand der Reaktion ein weißes, leicht absetzendes Koagulum. Nach mikroskopischer Untersuchung ist dieses jedoch nicht mit den so leicht erkennbaren Dextrinkristallen identisch, sondern besteht aus äußerst kleinen Kügelchen, die sich mit Jod blau färben und am ehesten mit den Körnchen der von *E. Roux* beschriebenen künstlichen Stärke verglichen werden könnten.

Durch die Möglichkeit einer fortlaufenden Darstellung der Amylase von *B. macerans* eröffnet sich ein äußerst interessantes Arbeitsfeld für die Stärkeforschung; über die bereits vorliegenden Ergebnisse wird an anderem Ort eingehend berichtet.

### Zusammenfassung.

1. Es wurden Kulturbedingungen angegeben, unter denen es gelingt, *Bacillus macerans* fortlaufend auf großen Substratmengen zu ziehen.

2. Bei Stärkelösungen als Substrat kristallisieren vielfach die *Schardinger*-Dextrine gegen Ende der Gärung aus.

3. Durch Filtration durch *de Haensche* Membranen wurden, ähnlich wie von *Hudson* und *Tilden* sowie von *Freudenberg* angegeben, bakterien- und sporenfreie Flüssigkeiten erhalten, die den Abbau der Stärke und die Bildung der kristallisierten Dextrine hervorrufen.

4. Durch Alkoholfällung wurden enzymhaltige Niederschläge erhalten, die nach dem Wiederlösen die volle Enzymaktivität entfalten.

5. Die Enzymwirksamkeit wurde viskosimetrisch in Amylaseeinheiten definiert.

6. Das Wirkungsoptimum liegt bei 55° C.

7. Bei Amylosen als Substrat steigt gleichlaufend mit dem Abfall der Viskosität die optische Drehung des Reaktionsgemisches zunächst deutlich an und sinkt dann auf den Anfangswert zurück.

8. Auch das Reduktionsvermögen der Amylosen nimmt zunächst zu und dann wieder ab.

9. Bei der *Macerans*-Hydrolyse kommt es zu enzymatischen Koagulationen der Amylosen-Sole.