

Eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Saccharase-Aktivität von Böden

Von Gg. Hoffmann*) und J. Pallauf

Aus der Bayer. Hauptversuchsanstalt für Landwirtschaft
der Techn. Hochschule München in Weihenstephan
Direktor: o. Professor Dr. Ed. Hofmann

(Eingegangen: 23. 7. 1965)

Saccharase war das erste Enzym im Boden, für das unser Institut eine Bestimmungsmethode entwickelt hat (Ed. Hofmann und A. Seegerer [6, 9]). Die Spaltung von Rohrzucker durch das in einer Bodenprobe enthaltene Enzym zu reduzierendem Invertzucker wurde nach 24 h Bebrütung bei 37° C in Gegenwart von Pufferlösung und Toluol mit einer Modifikation der Methode *Lehmann-Maquenne* (7, maßanalytische Kupfermethode) bestimmt. Auch unsere späteren Methoden für andere Enzyme benötigten lange Bebrütungszeiten.

Um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, verwendet die Enzymchemie möglichst kurze Inkubationsdauer. In der Zwischenzeit haben wir deshalb für verschiedene Enzyme (Phosphatasen, 2; Urease, 5; β -Glukosidase, 3) neue Methoden mit nur 3 h Bebrütungszeit ausgearbeitet. Innerhalb einer so kurzen Frist werden nur geringe Mengen an Spaltprodukten frei, die jedoch für kolorimetrische Bestimmungen ausreichen.

Im folgenden wird deshalb ein kolorimetrisches Verfahren beschrieben, das die Bestimmung von Saccharase im Boden nach 3 h Bebrütung gestattet. Dabei war zu berücksichtigen, daß der Boden ein unreines Enzympräparat darstellt und zahlreiche störende Faktoren in das Medium einbringt. Ihr Einfluß läßt sich jedoch wie bei anderen Zuckerbestimmungen durch Anwendung einer Kupfermethode ausschalten. Wir haben deshalb die Methode nach N. Nelson (8) in modifizierter Form angewendet.

I. Prinzip der Bestimmung

Boden wird mit Toluol, Rohrzucker- und Pufferlösung vom pH-Optimum des Enzyms (hier 5,5) 3 h bebrütet. Ein aliquoter Teil des Ansatzes wird mit einer carbonathaltigen Kupfersulfatlösung zur Reduktion des entstandenen Invertzuckers erhitzt. Das dabei ausgeschiedene Kupferoxydul reduziert anschließend zugesetztes Phosphomolybdat zu Molybdänblau, dessen Farbtiefe der Menge

*) Dr. Gg. Hoffmann, Bayer. Hauptversuchsanstalt für Landwirtschaft, 8050 Freising-Weihenstephan.

an Cu^I proportional ist. Die blaue Farbe wird kolorimetrisch gemessen und als Invertzucker berechnet. Neben dem Vollansatz wird ein Blindwert für Boden mit Puffer ohne Substrat und ein Kontrollwert für Substrat mit Puffer ohne Boden benötigt. Die Ergebnisse der Messung beider Kontrollen werden addiert und vom Hauptversuch abgezogen. Die Differenz ergibt die Aktivität der Bodenprobe.

Kupfermethoden verlaufen nicht streng stöchiometrisch, doch sind bei Einhaltung der vorgeschriebenen Reaktionsbedingungen die erhaltenen Werte reproduzierbar. Die Eichkurve muß daher nur einmal aufgestellt und gelegentlich überprüft werden. Auf diese Weise können bis zu 2 mg Invertzucker in 5 ml der Ansatzlösung bestimmt werden. Bei Böden mit hoher Enzymaktivität (Wiesen-, sehr kalkhaltige und Niedermoorböden) ist ein entsprechend geringeres Volumen zu verwenden.

II. Beschreibung der Methode

A. Reagentien

1. Toluol
2. 2 m-Essigsäure-Natriumacetat-Puffer pH 5,5
 - a) 120 ml Eisessig auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen
 - b) 164 g Natriumacetat, wasserfrei zu 1 l lösen
 - c) a : b wie 1 : 8 mischen und mit der Glaselektrode unter Verwendung der jeweils erforderlichen Ausgangslösung genau auf pH 5,5 einstellen
3. Substratlösung
Saccharose (handelsüblicher Rohr- bzw. Rübenzucker) 200 g zu 1 l lösen.
4. Kupferreagens
 - a) 150 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ mit dest. Wasser zu 500 ml lösen.
 - b) 25 g Na_2CO_3 , wasserfrei, 25 g Seignettesalz, 20 g NaHCO_3 , wasserfrei, und 200 g Na_2SO_4 , wasserfrei, nacheinander im 1-l-Meßkolben in ca. 600–700 ml Wasser lösen. Bei Zusatz des Sulfates schwach erwärmen, anschließend auf 1 l auffüllen und nach Zusatz einiger Tropfen Toluol bei 37° C im Brutschrank aufbewahren.
 - c) Zum Gebrauch 1 Teil a und 25 Teile b mischen.
5. $\text{m}/2 \text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung
17,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ zu 1 l lösen.
6. Molybdatlösung
 - a) 5%ige wäßrige Lösung von Ammoniumheptamolybdat
 - b) 200 ml conc. H_2SO_4 in 800 ml dest. Wasser unter Umschwenken eingießen, abkühlen.
 - c) Zum Gebrauch im Verhältnis 1 : 1 mischen (haltbar).

7. Eichlösung

a) Vorratslösung

100 mg Glucose und 100 mg Fructose (beide zur Chromatographie) mit dest. Wasser zu 200 ml lösen (1 ml = 1 mg Invertzucker). Im Kühlschrank unter Zusatz von etwas Toluol begrenzt haltbar.

b) Gebrauchslösungen

0, 5, 10, 15 usw. bis 50 ml 7a in 100 ml Meßkölbchen geben, dazu 10 ml Puffer 2c und auf 100 ml dest. Wasser auffüllen. Die Lösungen sind bei Bedarf frisch zu bereiten. 5 ml entsprechen 0, 250, 500, 750 usw. bis 2000 γ Invertzucker.

B. Vorgang

1. Bebrütung

10 g lufttrockener, auf 2 mm gesiebter Boden werden in 100 ml Weithals-Meßkölbchen mit 2 ml Toluol (bei Moorböden bis 5 ml) vermischt, nach 15 min mit 10 ml Substratlösung 3 und 10 ml Pufferlösung 2 versetzt, gemischt, versöpelt und 3 h bei 37° C bebrütet. Anschließend wird mit dest. Wasser von 38—40° C aufgefüllt (Toluol muß über der Marke stehen), gut gemischt und sofort durch Faltenfilter (z. B. Schleicher und Schüll 512 $\frac{1}{2}$) filtriert. Um klare Filtrate zu erhalten, wird der gesamte Kölbcheninhalt, einschließlich Boden auf das Filter gegeben.

Für jede Bodenprobe ist in gleicher Weise ein Blindwert mit Toluol, 10 ml Puffer 2 und 10 ml dest. H₂O anstelle mit Substratlösung herzustellen. Bei Serien von Böden mit gleichem Humusgehalt genügt ein Blindwert. Bei jeder neuen Lieferung Zucker ist ein Kontrollwert mit 10 ml Substrat und Puffer 2 mit Toluol (ohne Boden) anzusetzen und zu bebrüten. Der Wert gilt für alle weiteren Bestimmungen.

2. Messung der Aktivität

5 ml Filtrat werden zu 4 ml Kupferreagens 4c in 100 ml Meßkölbchen oder Reagensgläser (250 x 30 mm mit Marke bei 100 ml und Schliffstopfen) pipettiert, gemischt und 25 min im kochenden Wasserbad gehalten. Dabei darf das Sieden nicht unterbrochen werden. Das Wasser muß während der Kochzeit außen höher stehen als der Inhalt in den Kölbchen. Anschließend kühlt man in fließendem Wasser auf Raumtemperatur ab und setzt nacheinander 2 ml Lösung 5 und 5 ml Lösung 6c zu. Nach gründlichem Mischen (Vorsicht vor Übersäumen) bis alles Kohlendioxid entwichen ist, läßt man 1 h zur Entwicklung maximaler Farbintensität stehen, füllt mit dest. Wasser zur Marke auf, mischt nochmals und mißt die Extinktion ab 15 min nach dem Auffüllen bei 578 m μ in 2 cm Küvetten gegen den O-Wert der Eichkurve. Die Farbe ist bei Werten bis 1 mg Invertzucker mindestens 12, bei höheren Werten mindestens 7 h haltbar.

Aus der Eichkurve (mit den Lösungen 7b hergestellt) entnimmt man die Werte für Vollansatz, Blind- und Kontrollwert in γ -Invertzucker. Parallelen dürfen um nicht mehr als 25 γ voneinander abweichen. Die Differenz aus Vollansatz und der Summe von Blind- und Kontrollwert ist durch 50 zu dividieren und gibt die Saccharasezahl des Bodens an.

C. Angabe der Ergebnisse

5 ml Filtrat entsprechen 0,5 g Boden. 50, 100, 150 usw. γ abgespaltenen Invertzucker in diesem Volumen kann man 10, 20, 30 usw. mg pro 100 g Boden gleichsetzen. Diese Mengen bezeichnen wir als Saccharasezahlen 1, 2, 3 usw. in Anlehnung an die Aktivitätsbezeichnung bei unseren Methoden zur Bestimmung von Phosphatase (2), β -Glucosidase (3), Protease (4) und Urease (5). Bei den letzteren Enzymen haben wir als Einheit der Aktivität jeweils 1 mg Spaltprodukte/100 g Boden gewählt. Die Aktivität von Saccharase ist jedoch erheblich größer, weshalb wir hier als Einheit 10 mg Invertzucker (= 9,5 mg gespaltenen Rohrzucker) pro 100 g Boden eingesetzt haben.

D. Erfassungsgrenzen

Bei Böden mit niedrigen Blindwerten können Aktivitäten bis zu 39 Saccharasezahlen gemessen werden. Wiesenböden, insbesondere auf kalkhaltigem Muttergestein und Niedermoorböden haben oft höhere Aktivität. Man nimmt dann zur Bestimmung nur 2 ml und ergänzt mit 3 ml des Null-Wertes von Lösung 7 b. Die Verdünnung ist bei Angabe der Ergebnisse durch den Faktor 2,5 zu berücksichtigen.

Kleinere Aktivitäten als 0,5 Saccharasezahlen sind unsicher. In solchen Fällen kann die Bebrütungszeit bis auf 24 h verlängert werden, doch ist dies bei Angabe der Ergebnisse zu vermerken.

E. Beleganalysen

1. Wahl des Puffers

In der Originalmethode nach *Hofmann* und *Seegerer* (9) wurde ein Phosphatpuffer zur Einstellung des pH-Optimums der Saccharase benutzt, der viel Humus aus dem Boden extrahiert. Nach *Beres* und *Kiraly* (1) wirken aber verschiedene Humusstoffe als Reduktionsmittel auf Molybdatphosphorsäure. Deshalb erhält man mit Phosphatpuffer bei Böden mit Gehalten $> 2-3\%$ an gesamtorganischer Substanz sehr hohe Blindwerte. Bei Verwendung von Acetatpuffern sind diese hingegen niedrig (Tab. 1).

Wir haben deshalb einen Acetatpuffer von pH 5,5 durch Vereinigung von 1 Teil 2 m Essigsäure und 8 Teilen 2 m Na-Acetat hergestellt. 10 ml davon genügen um 10 g verschiedenartiger Böden mit ausreichender Genauigkeit im Bereich des breiten pH-Optimums der Bodensaccharase (Schwerpunkt bei pH 5,5) zu halten (Tab. 2).

Tabelle 1

Einfluß der Huminstoffe auf die Bildung von Molybdänblau (Extinktion $\cdot 10^3$ bei 578 m μ)
 The influence of humic acid on the formation of molybdenum blue
 (extinction $\times 10^3$ at 578 μ)

Boden		% Ges.- org. Sub.	Phosphatpuffer		Acetatpuffer	
Art			Blindwert nach Reduktion	Eigen- farbe	Blindwert nach Reduktion	Eigen- farbe
Miocänsand		0,26	8	11	0	0
Quartärdecklehm		1,33	125	67	0	4
Humus- carbonat- boden	Acker	6,60	310	260	16	6
	Wiese	9,10	1000	450	49	29

Tabelle 2

pH-Konstanz in Böden mit 2 m Acetatpuffer pH 5,5
 pH constancy in soils with a 2 M acetate pH 5.5 buffer

Boden		pH/KCl	pH-Wert durch Zusatz des Puffers nach	
Art			3 Stunden	24 Stunden
Miocänsand		6,10	5,40	5,40
Quartärdecklehm		5,80	5,45	5,45
Humus- carbonat- boden	Acker	7,15	5,65	5,70
	Wiese	7,20	5,70	5,75

Verschieden zusammengesetzte Puffergemische führen häufig zu Unterschieden in der Aktivität gleicher Enzymmengen. Maßanalytische Aktivitätsbestimmungen von Saccharase mit Phosphat- und Acetatpuffer vom pH-Wert 5,5 nach 24 h ergaben die gleiche Reihenfolge der Aktivität (Abb. 1). Die Gleichung der

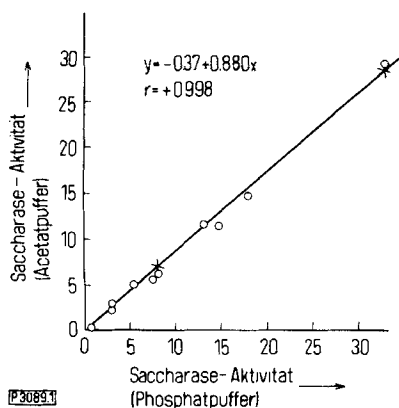


Abbildung 1

Aktivität der Saccharase im Boden mit
 Phosphat- und Acetatpuffer vom pH 5,5
 X Aus Kurvengleichung berechnete Punkte
 Activity of saccharase in soil with phosphate
 and acetate buffers at pH 5.5

Regressionsgeraden für die Acetat- auf die Phosphatwerte lautet $y = -0,37 + 0,844 x$. Sie zeigt an, daß bei 24 h Bebrütung mit Acetatpuffer rund 88% der mit Phosphatpuffer erzielbaren Aktivität erhalten werden. Der Korrelationskoeffizient von $r = +0,998$ ist bei 10 Proben für $P = 0,01\%$ signifikant. Wie noch gezeigt wird, ergibt sich jedoch bei 3 h Bebrütung eine Aktivierung der Bodensaccharase durch Acetatpuffer, weshalb wir auf dieses System in der neuen Methode übergegangen sind.

2. Modifikationen der Methode Nelson

a) Erzeugung und Messung von Molybdänblau

In der Originalvorschrift nach Nelson (8) läßt man das durch reduzierende Zucker aus der Kupferlösung ausgeschiedene Cu_2O auf Arsenomolybdat einwirken, das zu Molybdänblau reduziert wird. Um die Anwendung eines giftigen, arsenhaltigen Reagens bei einer Serienmethode zu vermeiden, haben wir es durch Phosphomolybdat ersetzt. Unsere Modifikation liefert ein ausreichend lange stabiles Molybdänblau (Tab. 3) mit schwachem Grünstich. Sein Absorptionsmaximum liegt bei $685 \text{ m}\mu$ (Abb. 2).

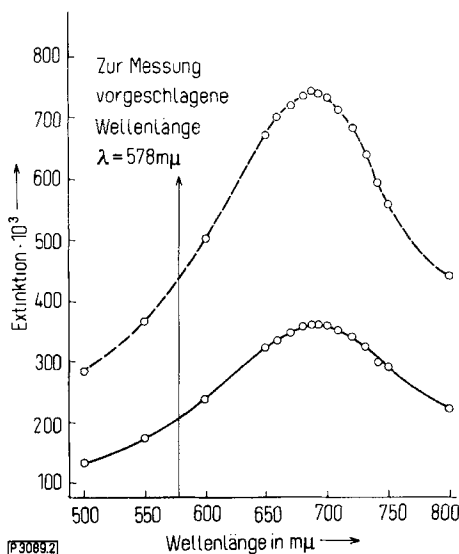


Abbildung 2

Absorptionsmaximum von Molybdänblau im System Acetatpuffer, Phosphomolybdat, Cu_2O

○ — ○ 500
 ○ - - ○ 1000

} γ Invertzucker

Absorption maximum of the system acetate buffer-phosphomolybdate- Cu_2O

Tabelle 3

Haltbarkeit des Molybdänblaus

(60 Minuten nach dem Einfärben wurde aufgefüllt, dann zu verschiedenen Zeiten gemessen)

Extinktion ($\cdot 10^3$) bei Messung nach dem Auffüllen

Stability of molybdenum blue (volume made up 60 minutes after color formation and measurements made at various times afterwards)

Eichwert	Minuten				Stunden	
mg Invertzucker	0	20	40	60	2	17
0	4	6	4	5	2	5
500	207	206	208	210	206	211
1000	470	464	462	464	464	467
2000	1131	1005	998	999	1001	968

Zur Messung der Aktivität wird die Wellenlänge $578\text{ m}\mu$ vorgeschlagen. Sie ist auf allen mit einer Quarzlampe ausgerüsteten Photometern in hoher spektraler Reinheit zu erlangen und erlaubt die Messung sehr hoher Aktivitäten ohne verdünnen zu müssen.

b) Reaktionsbedingungen bei der Reduktion der Kupferlösung.

In der Originalmethode nach *Nelson* wird 1 ml Kupferreagens mit 5 ml einer neutralen Zuckerlösung erhitzt. Unsere Analysenlösung ist auf pH 5,5 gepuffert. Wir haben deshalb geprüft, welche Reagensmenge erforderlich ist, um genügende Alkalität zu gewährleisten. Ab 3 ml wird ein konstanter pH-Wert knapp unterhalb desjenigen der Originalmethode erreicht. Aus Sicherheitsgründen verwenden wir 4 ml Kupferreagens (Tab. 4).

Tabelle 4

pH-Werte in der Reaktionslösung zur Zuckerbestimmung

pH of reaction solution in sugar estimation

ml neutrale Zuckerlösung	ml Enzymansatz pH 5,5	ml Kupferreagens	pH-Wert des Gemisches
5	—	1	9,4*
—	5	1	8,2
—	5	2	9,0
—	5	3	9,05
—	5	4	9,05

*) Originalmethode nach *Nelson*.

Durch die zur Stabilisierung des pH-Wertes erforderliche Erhöhung der Reagensmenge wird der Erfassungsbereich der Methode bis 2 mg Invertzucker erweitert. Damit können nahezu alle Böden mit 5 ml unverdünnter Ansatzlösung analysiert werden. Nur in den weiter vorn beschriebenen Fällen muß man auf 2 ml zurückgehen. Zur Erzielung vergleichbarer Werte ist das Volumen mit 3 ml der verdünnten Pufferlösung 2 (Nullwert der Eichkurve, Lösung 7c) auf 5 ml zu ergänzen (Tab. 5).

Tabelle 5

Extinktionen ($\cdot 10^3$) bei Verringerung der zur Bestimmung angewandten Analysenlösung auf 2 ml
 Extinction ($\times 10^3$) on reducing solution used for analysis to 2 ml

mg Invertzucker	5 ml Eichlösung auf pH 5,5 gepuffert	2 ml Eichlösung auf + 3 ml H ₂ O	pH 5,5 gepuffert pH 5,5 + 3 ml Puffer
160	77	70	78
320	170	164	172
800	448	437	450

3. Vergleich der neuen Arbeitsweise mit der Originalausführung der Saccharasebestimmung nach Hoffmann und Seegerer

Für diesen Vergleich dienten die in Abbildung 1 dargestellten 10 Böden von verschieden hoher Aktivität. Um eine unmittelbare Gegenüberstellung zu ermöglichen, wurde die mit der Originalmethode gemessene Aktivität nicht wie üblich in ml 0,1 n Na-Thiosulfatlösung pro 2 g Boden ausgedrückt, sondern in Saccharasezahlen umgerechnet. Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Regressionskurve. Ihre Gleichung lautet $y = 0,802 + 1,324 x$ was besagt, daß mit der neuen Methode um ca. 30 % höhere Aktivitäten gemessen werden (Abb. 3). Dieser Umstand gestattet bessere Unterscheidungen zwischen Proben mit geringen Unterschieden in der Aktivität.

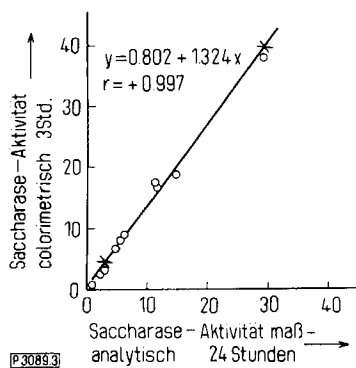


Abbildung 3

Vergleich der Saccharasebestimmung in Böden
nach der alten und der neuen Ausführung
der Methode

X Aus Kurvengleichung berechnete Punkte
Comparison of soil saccharase estimations
obtained from earlier and the new schemes

Der Korrelationskoeffizient von $r = + 0,997$ ist bei 10 verglichenen Proben für $P = 0,01\%$ signifikant.

Zusammenfassung

Eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Saccharaseaktivität in Böden wird beschrieben. Der aus Saccharose bei pH 5,5 (Acetatpuffer) abgespaltene Invertzucker wird mit dem Kupferreagens nach Nelson erhitzt, das

ausgeschiedene Kupferoxydul dient zur Reduktion von zugesetztem Phosphomolybdat zu Molybdänblau, welches bei 578 m μ kolorimetrisch bestimmt wird. Es besteht gute Übereinstimmung zwischen der neuen und der alten Arbeitsweise.

Schrifttum

- (1) Beres und Kiraly: *Agrokémia es Talajtan* 2, 245 (1956), ref. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 83, 64 (1958). — (2) Hoffmann, Gg.: Habilitationsschrift TH München 1965, Vorabdruck bei Ed. Hofmann in Paech/Tracey/Linskens „Moderne Methoden der Pflanzenanalyse“, Springer, Berlin, Göttingen und Heidelberg 1963, Band 6, S. 421 f. — (3) Hoffmann, Gg. und Dedeken, M.: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 108, 193 (1965). — (4) Hoffmann, Gg. und Teicher, K.: l. c. 3, 77, 243 (1957). — (5) Hoffmann, Gg. und Teicher, K.: l. c. 3, 95, 55 (1961). — (6) Hofmann, Ed. und Seegerer, A.: *Biochem. Z.* 322, 174 (1951). — (7) Medicus, L.: *Maßanalyse*, Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig, 17. Auflage, 1962, S. 260ff. — (8) Nelson, N.: *J. Biol. Chem.* 153, 375 (1944) aus Paech/Tracey l. c. 2, Band 2, S. 20 f. — (9) Thun, R., Herrmann, R. und Knickmann, E.: *Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (Methodenbuch)*, Band 1 „Die Untersuchung von Böden“, Neumann, Radebeul und Dresden 1955, 3. Aufl., S. 223 ff. [3089]

Über saure organische Verbindungen in Sproß, Wurzel und im steril gehaltenen Wurzelraum von Mais (Ein Beitrag zur Frage der Wurzelausscheidungen)

Aus dem Institut für Bodenkunde der Universität Göttingen

Von F. Scheffer*), R. Kickuth und H. Lorenz

(Eingegangen: 2. 8. 1965)

Die Abgabe organischer Verbindungen aus der Wurzel lebender Pflanzen ist seit vielen Jahrzehnten postuliert (2), der Beweis für die Richtigkeit dieser Ansichten jedoch erst in neuerer Zeit endgültig erbracht worden (5, 8, 10, 11, 13). Welche Rolle die Exkrete im System Boden und Pflanze spielen, wird in Zukunft ein weites Arbeitsgebiet der sich nun anbahnenden Untersuchungen bilden, von denen uns in letzter Zeit insbesondere die Wurzelausscheidungen der einzelnen Pflanzen und deren physiologische Bedeutung nicht zuletzt bei der Nährstoffaufnahme interessiert haben. In der hier gebrachten Arbeit war die Aufgabe gestellt, die sauren organischen Verbindungen in Sproß, Wurzel und im steril gehaltenen Wurzelraum von Mais zu untersuchen.

*) Prof. Dr. Dr. h. c. F. Scheffer, 34 Göttingen, v.-Siebold-Straße 4.