

light beams at the grid, α is the angle of contact of the drop with the slide, v is the volume of an individual droplet, d is the diameter of the droplet as measured in the picture, m is the magnification factor of the lens system E , and n is the index of refraction of the liquid of the droplet.

An enlarged picture of the dotted droplets is shown in Figure 4. The droplet sizes and curvatures as measured by this method are well correlated with those obtained by direct microscopic observation, by weighing or by chemical analysis of the droplets.

The significance of this method goes beyond the field for which it was developed: the technique can be applied to analysis of any spray, in food drying, fuel injection, etc. It may also be used for the determination of various values in the state of contact of two transparent bodies, such as the angle of contact between two immiscible liquids, surface tension, etc.

A more detailed paper including the theoretical and mathematical considerations underlying this method is currently in preparation.

Zusammenfassung. Krümmungen und Volumen einzelner Flüssigkeitströpfchen wurden mittels photographischer Methode bestimmt. Das Objekt wurde durch regelmässig streuende Lichtquelle beleuchtet und das Bild auf photographischer Platte festgehalten. Die regelmässigen Muster in den Tröpfchenbildern konnten zur Berechnung des Berührungszustandes der Tröpfchen mit dem Objektträger benutzt werden.

O. NOVICK and E. SHALEM

Israel Institute for Biological Research, Ness Ziona (Israel), July 1, 1964.

Ein Zellhomogenisator nach dem Prinzip von MERKENSCHLAGER und SCHLOSSMANN

Im Zellhomogenisator nach MERKENSCHLAGER et al.¹ werden die Zellen in Suspension mit Glasperlen durch eine sehr schnelle, exzentrische Drehbewegung des Gefässes innerhalb $\frac{1}{4}$ –2 min zerschlagen. Um eine Denaturierung der Eiweisse durch Erwärmung zu vermeiden, wird während des Schüttelprozesses stark gekühlt.

Figur 1 zeigt die Abbildung des neuen Homogenisators. An Hand von Figur 2 wird das Funktionieren der Apparatur erläutert. Der Drehstrommotor (1) (2800 Umdr./min, 50 Watt) treibt das Schwungrad (2), in welchem eine Büchse (3) exzentrisch gelagert ist. Die Büchse dient zur Aufnahme der Flasche mit Zellsuspension und Glasperlen. Sie wird durch den Stift (4) daran gehindert, um ihre eigene Achse zu drehen. Ein Schutzrohr (5), das am Motor befestigt ist, umgibt alle bewegten Teile und umschliesst ein Kugellager (6), in welchem die Schwungmasse (2) abgestützt ist.

Die Motorwelle ist durchbohrt und enthält ein Kapillarrohr (7), das stillsteht und mit Kugellagern in der drehenden Achse gehalten ist. Durch dieses wird zur Kühlung der Zellsuspension flüssige Kohlensäure aus einer Druckflasche mit Steigrohr in die Büchse (2) eingepresst. Der Expansionsraum in der Büchse ist gegen die Motorwelle und die Lager durch die Teflonbuchse (8) und den Ring (9) abgedichtet. Um zu verhindern, dass die Büchse aussen vereist, ist sie innen mit einem längsgerippten Polyäthylenmantel ausgekleidet (12). Die Flasche mit der Zellsuspension kann von vorne in den Mantel eingeschoben und mit gelochtem Deckel (10) gesichert werden. Die elastischen Rippen halten die Flasche fest, bedecken aber nur 20% ihrer Oberfläche, so dass ein guter Wärmeaustausch zwischen Flasche und Kühlgas, das zwischen den Rippen durchströmt, gewährleistet ist.

Der Stift (4) und seine Lagerung sind einer sehr grossen Beanspruchung ausgesetzt. Er ist aus hochlegiertem Konstruktionsstahl hergestellt und gleitet zwischen zwei Kugellagern (11). Die bewegten Massen sind sorgfältig ausbalanciert, so dass die Erschütterungen gering sind.

Das Gerät ist auf einer massiven Grundplatte (13) mit Gummifüssen befestigt. Da die Homogenisierungszeit für reproduzierbare Resultate genau eingehalten werden muss, wird sie automatisch durch einen Impuls gesteuert. Die hierfür erforderlichen elektrischen Elemente sind auf der Unterseite der Grundplatte angeordnet.

Prüfung des Homogenisators. Um Anhaltspunkte über die Leistungsfähigkeit des beschriebenen Homogenisators zu erhalten, wurden Versuche mit Hefe durchgeführt. Hefe gilt als ein verhältnismässig schwer aufschliessbarer Organismus. Den Grad des Zellaufschlusses verfolgten wir mikroskopisch und durch Bestimmung des löslichen Proteingehaltes und der Enzymaktivität. Als Enzymtest dient die Umwandlung von TPN⁺ zu TPNH, die zur Hauptsache, aber nicht ausschliesslich, auf die Tätigkeit

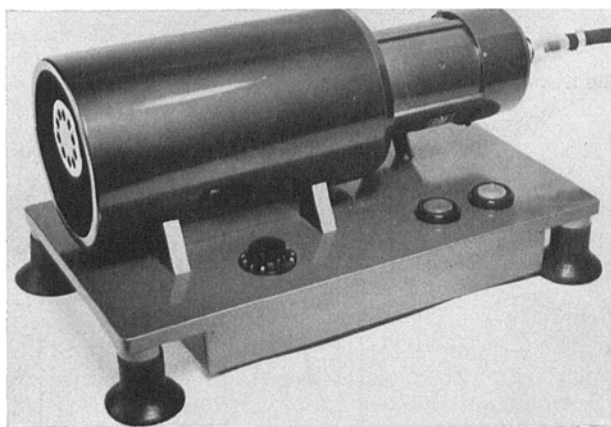


Fig. 1

¹ M. MERKENSCHLAGER, K. SCHLOSSMANN und W. KURZ, *Biochem. Z.* 329, 332 (1957).

der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zurückzuführen ist.

Experimentelles. Gepresste Bäckerhefe wird durch dreimaliges Aufschlännen in Eiswasser und niedertouriges Zentrifugieren ($1400 \times g$) gewaschen und dann mit Eiswasser im Gewichtsverhältnis 1:1 aufgewirbelt. Es wird von nun an dafür gesorgt, dass die Temperatur nicht mehr über 4°C steigt. In die vorgekühlten Homogenisierungsflaschen (Duranglas mit eingeschliffenem Stopfen) werden 50 g Glasperlen vom Durchmesser 0,25–0,30 mm und je 10 g der vorbereiteten Hefesuspension eingewogen. Unter genügender CO_2 -Kühlung werden die einzelnen Suspensionen verschieden lange Zeiten homogenisiert. Darauf wird ihr Inhalt mit 10 ml Eiswasser in Zentrifugenbecher gespült und in der Kühltzentrifuge während 20 min bei $13000 \times g$ die Glasperlen und größeren Zellbestandteile niedergeschlagen. Hierauf wird der Überstand ein zweites Mal während 1 h bei $30000 \times g$ zentrifugiert. Den opaleszierenden Überstand hebert man vorsichtig ab und untersucht ihn auf Proteingehalt und Enzymaktivität.

Die Proteinbestimmung wurde mit der Biuretmethode nach BEISENHERZ² durchgeführt. Für den Enzymtest galt folgender Ansatz: 2 ml 0,1 M Tris-Puffer (pH 8,0); 0,2 ml 0,1 M MgCl_2 -Lösung; 5 μM Glucose-6-Phosphat;

je nach Aktivität 0,05–0,5 ml Extrakt; Start mit 4 μM TPN⁺. Mit H_2O wurde jeweils auf 4 ml Endlösung aufgefüllt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 366 m μ , bei Zimmertemperatur. Zur Berechnung der Resultate diente der Extinktionskoeffizient $E_{366}^{\text{TPNH}} = 3450$.

Für die mikroskopische Untersuchung wurden den Homogenisaten jeweils vor dem Zentrifugieren kleine Proben entnommen. Auf mikroskopischem Wege lassen sich durch direkte Beobachtung die intakten Zellen von den defekten leicht unterscheiden. Durch Auszählung der intakten und defekten Zellen in der Zählkammer (pro Versuch wurden ca. 300–400 Zellen erfasst) erhält man ein Mass für den Homogenisierungsgrad.

Resultate und Diskussion. Figur 3 zeigt die mikroskopischen Bilder von Hefezellen vor und nach der Homogenisierung. Bei kurzer Homogenisierungsdauer scheinen die Zellen durch einen zentralen Stoss der Glasperlen gleichsam zum Platzen gebracht worden zu sein. Bei

² G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADÉ, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953).

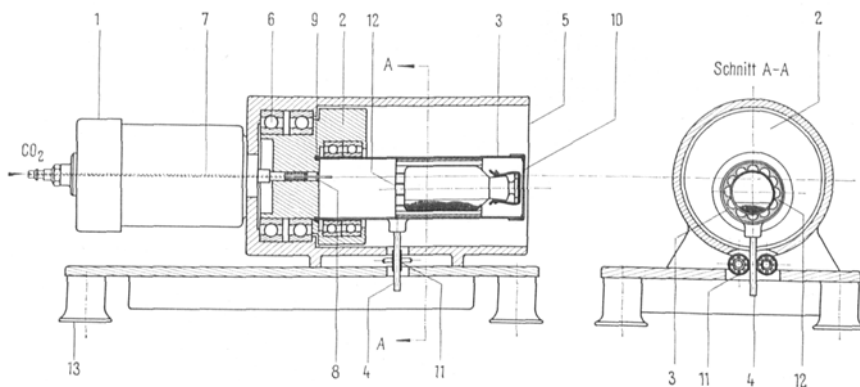


Fig. 2

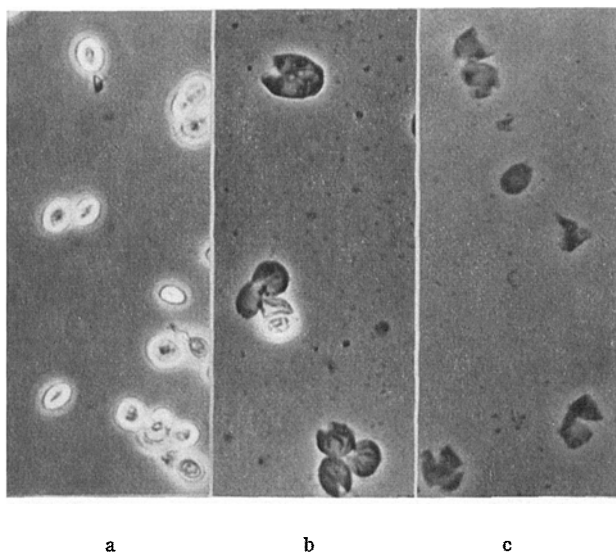


Fig. 3. Homogenisierte Bäckerhefe im Phasenkontrastmikroskop. a, nicht homogenisiert. b, 30 sec homogenisiert. c, 3 min homogenisiert.

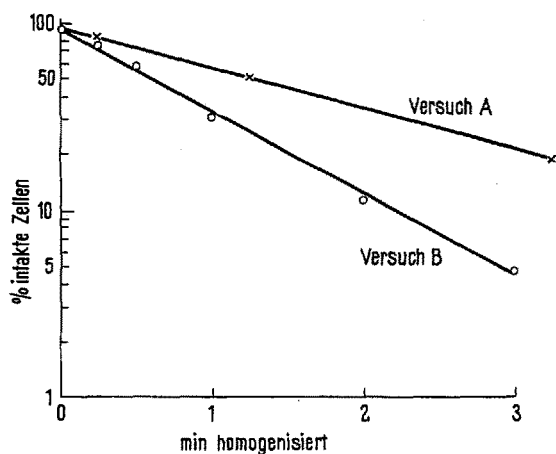


Fig. 4. Zahl der noch intakten Hefezellen nach der Homogenisierung in Abhängigkeit der Homogenisierungsdauer. (5 g feuchte Hefe, 5 g Wasser, 50 g Glasperlen \varnothing 0,25–0,30 mm.)

längerer Homogenisierungsdauer werden die Membranen noch weiter zerstört.

In Figur 4 ist die Anzahl intakter Zellen (in log Darstellung) in Abhängigkeit der Homogenisierungsdauer graphisch dargestellt. MERKENSCHLAGER et al. bestimmten mit Hilfe des Wachstumstestes die Zahl der überlebenden Zellen und erhielten höhere Zerstörungswerte als wir. Nach unserer Methode werden jedoch lediglich die mikroskopisch erkennbar zerstörten Zellen erfasst.

Die Beziehungen zwischen löslichem Protein und der Enzymaktivität in Abhängigkeit der Homogenisierungsdauer sind in Figur 5 zusammengestellt. Der Proteingehalt des Extraktes (Kurve b, Figur 5) bezieht sich auf das Gewicht der eingesetzten Hefe. Mit zunehmender Homogenisierungsdauer steigt der Proteingehalt zunächst steil an; später ist nur noch ein schwacher Anstieg

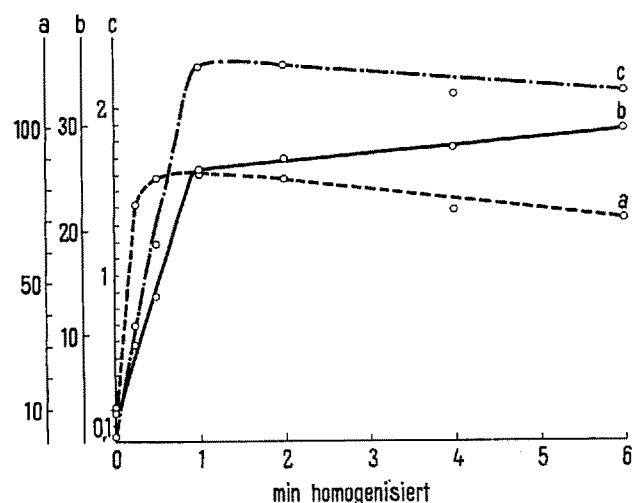


Fig. 5. Proteingehalt und Enzymaktivität des Hefehomogenisates in Abhängigkeit der Homogenisierungsdauer. a, μ Mole TPNH gebildet pro min und mg Protein. b, mg Protein in Lösung pro g Hefe. c, mMole TPNH gebildet pro min und g Hefe.

festzustellen. In der ersten Phase der Homogenisierung werden die Zellen geöffnet, das lösliche Cytoplasmprotein geht in Lösung. Durch die weitere Homogenisierung werden aber auch die freigesetzten Zellpartikel und die leeren Membranen weiter zerstört und geben ihrerseits ebenfalls etwas lösliches Protein ab. Da dieser Prozess jedoch viel schwerer verläuft und bedeutend weniger lösliches Protein liefert, steigt die Proteinkurve nach der Entleerung der Zellen nur noch schwach an.

Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist ein lösliches Enzym, deshalb zeigt ihre Aktivitätskurve (Kurve c, Figur 5) einen ähnlichen Anstieg wie die Proteinkurve (Kurve b). Bei längerer Homogenisierungsdauer sinkt die Aktivitätskurve jedoch wieder langsam ab. Dies bedeutet einmal, dass die schwerer in Lösung zu bringenden Proteine arm an TPN⁺-aktiven Enzymen sind, dann aber auch, dass bei längerer Homogenisierungsdauer die Aktivität des Enzymes, wohl durch teilweise Denaturierung (Schaumbildung), etwas herabgesetzt wird.

Ähnliche Resultate, wie wir sie bei der Hefe erzielt haben, konnten auch beim Schimmelpilz *Neurospora crassa* erhalten werden. Bei diesem stark vernetzten Schimmelpilz ist der Aufschluss jedoch viel schwerer. Mit Vorteil werden Schimmelpilze deshalb durch Einfrieren im CO₂-Schnee und nachheriges Zerreiben im Mörser vorzerkleinert³.

Summary. The construction of a very effective cell homogenisator based on the principle of MERKENSCHLAGER et al. is described. This apparatus permits one to obtain, in a short time, highly active preparations of soluble enzymes and fully active and intact cell components.

W. BOLLIGER, A. BOSCHETTI
und E. C. GROB

Theodor-Kocher-Institut und Institut für organische Chemie
der Universität Bern (Schweiz), 12. Juni 1964.

³ Diese Arbeit ist mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds durchgeführt worden, dem wir dafür unseren besten Dank aussprechen.