

Algemene artikels en berigte

Die gebruik van rekenaars in tersiêre chemieonderrig

M.M. de V. Steyn

Rekenaargesteuende Onderrig, Fakulteit Natuurwetenskappe

Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, Potchefstroom, 2520

ABSTRACT

The implementation of computers in tertiary chemistry education

The implementation of computers in chemistry education since 1960 is described. Computers can be applied effectively to redress weaknesses in the basic scientific knowledge of students, as well as to augment their practical experience of chemical processes. Often the description or the explanation of chemical processes relies on mathematical and physical models that are three dimensional and dynamic and that can be presented elegantly with digitized images on computer. Current demands on lecturers and students, as well as didactic applications of computers in tertiary teaching are briefly described under the following headings: computer literacy, subject or task specific applications, computer aided testing, computer aided learning, interactive multimedia, the use of electronic media for lecture presentations, Internet, and mass education. To meet the demands of the modern working environment, students need certain basic computer skills and in this respect universities have an important responsibility. With modern technology at our disposal, we find ourselves on the threshold of a revolution that will make quality education available to all the people of our country. The primary goal of the implementation of computers remains to be the improvement of the quality, relevance and access of learning - computers are merely one element in an educational programme. The critical questions to ask regarding the use of computers in education are, does it work, do students like it, do students learn and does it justify the cost.

Rekenaars word nie meer beskou as toerusting wat hoofsaaklik vir die oplos van komplekse wiskundige probleme of die prosessering van groot hoeveelhede data aangewend word nie, maar kan as hoogs gesofistikeerde tutors gebruik word. In chemieonderrig het rekenaars die afgelope dertig jaar in 'n toenemende mate toepassing gevind. Chemie berus grootliks op die beskrywing en verklarings van chemiese prosesse wat staatmaak op die visualisering van wiskundige en fisiese modelle. Baie van hierdie modelle is driedimensioneel en dinamies van aard, en dit is juis om hierdie rede dat rekenaars met soveel voordeel in chemieonderrig aangewend kan word.

In die jare 1960 tot 1970 het die eerste toepassings van rekenaargesteuende onderrig (RGO) op hoofraamrekenaars ontstaan. Die bekendste hiervan is die PLATO-projek wat deur die Amerikaanse regering befonds is en deur die Universiteit van Illinois bestuur is. Dit het aan opvoedkundiges 'n programmeringsomgewing gebied, asook die moontlikheid om die aanbieding van lesmateriaal te administreer en om rekords van studenteprestasie te hou. In 1980 het die Universiteit van Wes-Kaap (UWK) die eerste universiteit in Afrika geword om die PLATO-sisteem te gebruik. Met 132 terminale het hulle onderrig aan 7000 universiteitstudente verskaf, asook aan 700 wiskunde- en wetenskapleerlinge wat betrokke was by die Universiteit se uitreikprogram. Ander Suid-Afrikaanse universiteite wat hierdie voorbeeld gevolg het, was Rhodes Universiteit en die Universiteite van Zululand en Pretoria. In 1978 het die mikrorekenaar egter sy verskyning gemaak, en as gevolg van koste-oorwegings en die Apple Macintosh se kragtige grafiese vermoëns, het die Apple-mikrorekenaar die gewildste afleweringmodus geword. Universiteite soos dié van Witwatersrand het rekenaars aangeskaf en begin om hulle eie RGO-toepassings te ontwikkel. Met die koms van die

IBM persoonlike rekenaar en lokale-areanetwerke(LAN) met een of meer lêerbedieners, het hoofraamstelsels op kampusse feitlik totaal in onbruik verval. Dit het 'n nuwe golf van sagteware laat ontstaan wat vir die IBM-omgewing geskryf of herskryf is. Ontwikkelingswerk is hoofsaaklik met spyskaartgedrewe outerstelsels gedoen waarvoor daar min programmeringsvaardighede vereis is. Die Universiteite van Kaapstad en Pretoria, Rhodes Universiteit en die Universiteit van Suid-Afrika het die voortou geneem en RGO-eenhede in die lewe geroep waar ontwikkelingswerk gedoen is.

Die aanwending van rekenaars het 'n wye spektrum van didaktiese toepassings en kan soos volg opgesom word:

- **Rekenaargeletterdheid** wat onder andere kennis van beheerstelsels en vaardigheid in die gebruik van woordverwerkings-, sigblad-, databasis- en grafiese pakkette behels. Hierdie aanwending is meerdoelig van aard en word vir die uitvoering van talle onderrig- en navorsings-take, sowel as administratiewe take gebruik. In die opvoedkundige omgewing is die gebruik van bibliografiese databasisse en ander inligtingontsluitingsagteware van groot belang.
- **Vak- of taakspeifieke aanwendinge** wat praktykgerigte programmatuur soos dataversameling-, modellering-, ontwerp-, statistiese, besluitnemingsagteware, asook kundigheidstelsels behels.
- **Rekenaargesteuende toetsing (RGT)** wat die rekenaar-matige samestelling en nasien van toetse behels deur gebruik te maak van itembanke waaruit vroeë ewekansig volgens voorafbepaalde spesifikasies saamgestel word. RGT hou nie alleen voordele vir die dosent in deurdat dit die afneem van toetse en administratiewe werk vereenvoudig nie, maar gee aan studente direkte en vinnige terugvoer oor sy prestasie. Dit kan ook vir inoefening en

remediëring aangewend word deur geïndividualiseerde terugvoering op rekenaar aan studente te gee.

- **Rekenaargestuende onderrig (RGO)** wat soos in die geval van die PLATO-stelsel vakkennis rekenaarmatig aan studente oordra. Studente kan teen eie pas werk en omdat die studente in beheer van hulle eie leerproses is, kan die aanbieding derhalwe by die student se leerstyl aanpas. Vir afstandsonderrigstudente hou dit die bykomende voordeel in dat dit interaktief aangebied word en die isolasie verminder, asook dat dit nie tyd of plek gebonde is nie. Die pionier in die bevordering van hierdie sagteware vir chemie is prof. Joe Lagowski van die Universiteit van Texas wat die Seraphim-konsortium tot stand gebring het waar opvoedkundiges sagteware kan uitruil. Tans word die verspreiding daarvan deur die *Journal of Chemical Education Software* behartig.
- **Interaktiewe multimedia (IMM)** wat RGO 'n stappe verder voer deur 'n verskeidenheid van media soos beeld, klank, teks en data as versyferde multimedia te integreer. Die opwindendste hiervan vir chemieonderrig is die inkorporering van bewegende videobeelde wat studente se praktiese ervaring van werklike situasies verbreed en verryk. Die interaktiwiteit wat in lesse ingebou word, vereis aktiewe betrokkenheid van studente en die hiperskakels maak dit vir studente moontlik om deur middel van veelvuldige keuses hulle eie kennis te konstrueer. Die eerste groep wat met die ontwikkeling van multimedia-pakkette vir chemie begin het, was by die Universiteit van Illinois gesetel en hulle bemark saam met ander opvoedkundiges 'n groot verskeidenheid sagteware op optiese skywe (CD-ROM) onder die handelsnaam Falcon Software.
- **Die elektroniese klaskamer** waar dosente van 'n verskeidenheid elektroniese media gebruik maak om konsepte tydens lesings te illustreer. 'n Aanbieding kan vooraf op 'n draagbare mikrorekenaar voorberei word deur beeldmateriaal te versyfer - 'n wye spektrum van outeurs-pakkette is op die mark beskikbaar waarmee teks, grafieke, animasies, en videomateriaal vir lesse geïntegreer kan word. Sommige chemiehandboeke word sedert die afgelope jaar of twee saam met IMM-pakkette op CD-ROM bemark. Die kritiese vraag word hedendaags gestel of sekere fasette van die onderrig wat 'n chemiestudent tradisioneel in die laboratorium aanleer nie in 'n groot mate met rekenaaraanbiedings vervang kan word nie. Opvoedkundiges is dit eens dat die aanleer van manipulasievaardighede in die laboratorium moet

plaasvind. Is dit noodsaaklik dat waarneming, interpretasie, dataversameling, dataverwerking, aanbieding van resultate en verslagskrywing in die laboratorium plaasvind?

- **Internet** wat 'n wêreldwye vloe van inligting deur 'n net van rekenaarnetwerke is. Die ontstaan van die NSFNET-netwerk in 1986 het die verbinding van opvoedkundige instansies deur die hele VSA moontlik gemaak. Kort daarna het UNINET, die universiteitsnavorsingsnetwerk in Suid-Afrika, tot stand gekom en vanaf 1993 het talle kommersiële voorsieners tot stand gekom. Die revolusie in inligtingstechnologie het tot gevolg dat die koste van prosessering, stoor en oordrag van inligting met 50 persent elke agtien maande verminder. Universiteite in kuberruimte wat kursusse via interaktiewe elektroniese kampusse aanbied, bestaan reeds.
- **Massa-opvoeding** waar rekenaars 'n sleutelrol gaan speel om onder andere in leemtes in basiese wetenskaplike kennis op alle vlakke te voorsien. Nuwe tegnologie wat nie kables benodig nie, maak dit moontlik om kennis na die mees afgeleë dele van Afrika te bring. 'n Konsortium, Telematika vir Afrika Ontwikkeling, is reeds deur bemiddeling van die Wêreldbank in die lewe geroep om die inisiatiewe van rolspelers in afstandsonderrig in Suid-Afrika te koördineer en te optimaliseer. Ons staan op die drumpel van 'n revolusie wat kwaliteitsopvoeding vir almal in ons land toeganklik sal maak.

Universiteite besef dat studente oor sekere algemene rekenaarvaardighede moet beskik, sowel as vaardighede in die gebruik van vakspesifieke sagteware, om aan die eise van die moderne werksomgewing te voldoen. Die meeste Suid-Afrikaanse universiteite bied verpligte kursusse vir B.Sc.-studente aan waar sowel meerdoelige as vakspesifieke toepassings aandag geniet. RGT word reeds op 'n groot skaal by onder andere die Universiteite van Kaapstad en Pretoria aangewend. By die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys val die klem op toetsing, die inoefen van vrae deur studente en aanwendinge in die praktiese komponente van wetenskaplike vakke.

Die primêre doel met rekenaargebruik bly steeds die verbetering van die gehalte, relevansie en toeganklikheid van die onderrig - rekenaars is slegs een van die elemente in 'n onderrigprogram. Die kritiese vrae wat met die implementering van rekenaars vir onderrig gevra moet word, is: werk dit, hou die studente daarvan, leer die studente en regverdig dit die koste.

Herwinning van goud met koolstof

M.W. Johns

Afdeling Hidrometallurgie, Mintek, Privaat sak X3015, Randburg, 2125

Daar is in 1847 die eerste keer verwys na die vermoë van koolstof om edelmetale te adsorbeer. In 1880 is daar vasgestel dat goud met houtskool uit gechloureerde loogvloeiwater herwin kan word. McArthur en die broers Forest het in 1894¹ ontdek dat sianied 'n goeie loogmiddel vir goud is, en

houtskool is in 1894 gebruik om goud uit sianiedoplossings te herwin. Die houtskool is van hout verkry en het nie die groot oppervlakte en poreusheid van die hedendaagse koolstof gehad nie. Aangesien daar geen elueerprosedure bestaan het nie, is die goud deur uitsmelting uit die koolstof

herwin. Die gebruik van koolstof het in 1917 'n hoogtepunt van doeltreffendheid in Australië bereik toe fyn koolstof gebruik is om goud uit 'n dragtige oplossing te herwin, maar namate die sinksementeerproses verbeter het, het belangstelling in die gebruik van koolstof afgeneem.

Gedurende die veertigerjare is daar 'n koolstof met 'n hoër aktiwiteit en groter slytweerstand van vrugtepitte gemaak en in 1952 is daar 'n elueerprosedure ontwikkel wat van natriumhidroksied en sianied gebruik maak (die bytsianied-prosedure).² 'n Aanleg wat van koolstof gebruik gemaak het, is in 1960 in Kanada opgerig. Die eerste belangrike koolstof-in-pulp(KIP)-aanleg om die slyk (fraksie waaruit die growwe materiaal verwyder is), te behandel (2 200 ton per dag), is in 1973 te Homestake in die Verenigde State opgerig.

Daar was belangrike verdere ontwikkelings in Suid-Afrika in verband met KIP vir die behandeling van die totale gesianidiseerde pulp. 'n Klein proefaanleg was in 1976 in werking, en teen 1978 'n aanleg wat 250 t/d verwerk het. Die KIP-proses is tans oor die hele wêreld die voorkeurmethode vir die herwinning van goud uit gesianidiseerde pulp. Die enigste uitsondering is blykbaar die Sowjet-Unie waar die hars-in-pulp-proses gebruik word. Die KIP-proses word gebruik vir die behandeling van 'n verskeidenheid voermateriale wat wissel van onbehandelde erts tot mynhoopmateriaal.

Die voordele van die KIP-proses vergeleke met sinksementering is:

- (1) Die kapitaalkoste is laer.
- (2) Die bedryfskoste is laer.
- (3) Die koolstof se vermoë om goud te adsorbeer word nie deur enige van die gewone bestanddele van loogvloeiwater beïnvloed nie.
- (4) Die koolstof word direk by die gesianidiseerde pulp gevoeg, dus word die duur filtreer-en-verheldering-stap uitgeskakel.
- (5) Die verlies van oplosbare goud is gewoonlik laer as met die sinksementeerproses.
- (6) Ertse wat koolstofhoudende materiaal bevat, kan sonder verlies van goud tot die koolstofhoudende fraksie verwerk word.
- (7) Materiaal wat moeilik filtreer of verdik, kan suksesvol behandel word.

Adsorpsie van goud deur koolstof

Geaktiveerde koolstof het 'n poreuse struktuur. Die volgende teorieë is al aangevoer vir die meganisme waardeur geaktiveerde koolstof goudsianied laai:

- (1) algehele reduksie tot metaal;
- (2) 'n chemiese presipitatie meganisme waardeur goud, koolstofmonoksied en sianied betrokke is;
- (3) fisiese adsorpsie van natriumdisiaanouraat(I);
- (4) adsorpsie van die disiaanouraat(I)ioon;
- (5) ionruiladsorpsie van die disiaanouraat(I)ioon;
- (6) adsorpsie van 'n neutrale kompleks waarvan die aard van die pH afhang;
- (7) elektrostatiese wisselwerking tussen die disiaanouraat(I)ioon en positiefgelaaide setels,
- (8) 'n fisiese adsorpsieproses;
- (9) 'n tweestapproses waarin 'n ionpaar op koolstof geadsorbeer en dan tot 'n ongeïdentifiseerde spesie gereduseer word.

Laasgenoemde teorie word tans algemeen aanvaar.

Die adsorpsie van goudsianied op geaktiveerde koolstof is omkeerbaar. Daar bestaan dus 'n ewewig tussen die goud in oplossing en die goud wat op die koolstof gelaai is. Die faktore wat die tempo van goudadsorpsie beïnvloed en dié wat die ewewigsgoudlading beïnvloed, word in tabel 1 gelys.

TABEL 1 Faktore wat die adsorpsie van goud deur koolstof beïnvloed		
Faktor	Uitwerking van 'n verhoging van die faktor	
	op die tempo	op die ewewigsgoudlading
pH	geringe afname	afname
Ioonsterkte	geringe afname	toename
Vrye sianied	geringe afname	afname
Temperatuur	geringe toename	afname
Onedelmetale	afname	afname
Partikelgrootte van koolstof	afname	geen
Mengintensiteit	toename	geen
Pulpdigtheid	afname	geen

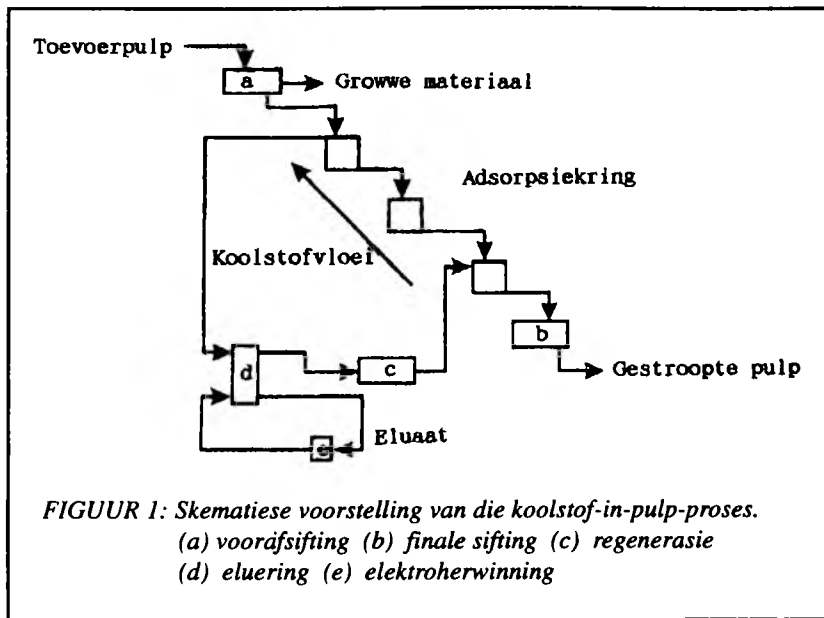
Sekere stowwe vergiftig geaktiveerde koolstof vir goudadsorpsie. Kalsiumkarbonaat kan in die porieë presipiteer en is nadelig vir adsorpsie, maar kan verwyder word deur die koolstof met suur te was. Organiese materiaal (bv. masjiensmeermiddels, reinigers, flottasiereagense) vergiftig ook die koolstof in 'n sekere mate, maar word tydens die reaktivering verwyder. 'n Laer adsorpsiedoeltreffendheid word verkry wanneer pulp wat kabien, skalie of klei bevat, gebruik word aangesien hierdie fyn verdeelde minerale die porieë kan verstop. Koper kan die adsorpsiedoeltreffendheid verlaag deur, veral by lae sianiedkonsentrasies, met die goud mee te ding om adsorpsieplekke (veral by lae sianiedkonsentrasies).

Koolstof-in-pulp-proses

Ertse wat 0,25 - 100 g/t goud bevat, word in KIP-aanlegte verwerk in tonnemat van 100-10⁶ t per maand. Die digtheid van die pulp wissel van 1,3 tot 1,45 g/cm³, afhangende van die viskositeit daarvan.

Die figuur toon 'n skematiese voorstelling van 'n KIP-aanleg. Die gesianidiseerde pulp word vooraf gesif om die growwe materiaal te verwyder wat andersins saam met die koolstofkorrels sal beweeg en later die siwwe in die KIP-kring kan verstop. Daarna vloei die pulp deur 'n reeks van ses of agt silindriese platboomroertenks. Die tipiese verblyftyd van die pulp per stap is 1 uur. Gereaktiveerde koolstof word in die laaste stap bygevoeg en beweeg stroomop teen die vloei van die pulp. Die koolstof word deur tussenstapsiwwe in elke stap gehou. Die tipiese verblyftyd van die koolstof in elke stap is 1 - 2 dae. Die koolstofkonsentrasie in 'n KIP-kring is 15-30 g per liter pulp. Die gestroopte pulp wat die kring verlaat, word gesif om die fyn koolstof te verwyder.

Die gelaaiete koolstof wat tussen 200 en 20 000 g goud per ton bevat, word periodiek uit die eerste stap verwyder en met 'n bytsoda- of 'n bytsianiedoplossing geëluëer. Die koolstof word met suur gewas om die kalsiumkarbonaat te



verwyder en dan by 'n hoë temperatuur in 'n oond gereaktiveer. Die goud in die eluaat word gewoonlik deur elektroherwinning herwin.

Sifting

Die totale pulpfraksie moet *vooraf gesif* word deur 'n sif met openinge kleiner (0,5 tot 0,6 mm) as dié van die tussenstapsiwwe. Die voorsifting verwyder die growwe materiaal en houtspaanders om te voorkom dat die siwwe verder af in die kringloop verstop raak. Houtspaanders maak 'n klein fraksie van die inkomende pulp uit, maar kan probleme verder in die kringloop veroorsaak. Daar word twee soorte siwwe gebruik:

- (1) Vibreersiwwe met 'n geweefde draad- of poliuretaanmaas, en
- (2) lineêre bewegendebandsiwwe.

Die lineêre bandsif is die voorkeureenheid.

Tussenstapsiwwe word gebruik om die koolstof terug te hou terwyl die fyner pulp verder deur die reeks tenks vloei.

Die twee soorte siwwe wat gebruik word, is eksterne en ondergedompelde siwwe. Met *eksterne* siwwe word die pulp deur lug op die siwwe (gewoonlik vibrerende dekke) gelig en na die volgende stap oorgedra, terwyl die koolstof teruggevoer word na die stap vanwaar dit gekom het. Daar is 'n aantal *ondergedompelde siwwe* ontwikkel. Siwwe wat met lug skoongemaak word, maak gewoonlik van vierkantige metaalmaas gebruik terwyl siwwe wat meganies skoongemaak word, van wigdraad gebruik maak. Die dienslas op hierdie siwwe wissel van 50 tot 200 m³ pulp per vierkante meter sif per uur. Die openinge van die siwwe is ongeveer 0,8 mm. Die ondergedompelde NKM (North Kalgoorlie Mine)-sif wat meganies skoongemaak word, het die voorkeureenheid geword. Die grootte van die koolstofpartikels wat in KIP gebruik word, is 1-2 mm, hoewel groter partikels gebruik word wanneer probleme met die sifting ondervind word.

Geslyte koolstof, wat veroorsaak word deur die breek van die koolstof in die KIP-kring, word deur 'n *finale sif* uit die bar pulp herwin. Die eenhede en openinge van hierdie sif is soortgelyk aan dié wat vir die voorsifting gebruik word.

Tussenstapbeweging van die koolstof word deur lugpompe, vertikale spilpompe, sentrifugale pompe of peristaltiese pompe bewerkstellig.

Faktore wat die keuse van 'n pomp beïnvloed, is beheerbaarheid, koolstofslytasie en bedryfskoste. Die koolstof word in die meeste aanlegte met tussenposes oorgedra, maar dit kan ook deurlopend geskied.

Roering

Die optimale roerstelsel gee 'n hoë pulpvloei en 'n lae skuifkrag om te voorkom dat die koolstof breek. Meganiese roering word bo lugroering verkies omdat dit minder krag verbruik en 'n beter "aktiewe" houervolume en aanvaarbare koolstofafsluytempo gee. Trekbuis en roerders met oop stewers word gebruik.

Die kraginset wissel van 0,015 tot 0,2 kW/m³ pulp.

Die pompsel (pump-cell)

Die *pompsel* is 'n alternatiewe adsorpsiekontaktor wat uit 'n gewysigde NKM-sif in 'n oop tenk bestaan. Die tradisionele KIP-reaktor maak gebruik van lae koolstofkonsentrasies, lang pulpverblyfytie en 'n lae roerintensiteit. Die pompsel gebruik hoë koolstofkonsentrasies, kort pulpverblyfytie en 'n matige roerintensiteit. Die *pompsel* word so genoem vanweë sy vermoë om as 'n hefboom na die volgende stap te dien sodat dit nie nodig is om die kontaktors verspringend aan te bring nie. Dit beteken dat die koolstof volgens die mallemeule-metode oorgedra kan word.

Eluering

Die goudladingsvermoë van koolstof neem af met 'n styging in die temperatuur. 'n Toename in die konsentrasie van sianied en hidroksiedione verminder ook die koolstof se vermoë om goud te adsorbear.

Hierdie twee feite is in 1952 deur Zadra² gebruik om die eerste doeltreffende elueertegniek om goud uit die koolstof te verwyder, te ontwikkel. Daar is sedertdien ander elueerprosedures ontwikkel.

Die *Zadra-proses* behels die hersirkulering van 'n oplossing met 1-2% natriumhidroksied deur 'n koolstofbed, teen 'n temperatuur hoër as 85 °C en 'n vloeitempo van ongeveer een bedvolume per uur. Die eluering neem 48 uur om te voltooi. 'n Elektroherwinningsselsel word gebruik om die goud uit die eluaat te herwin. Die voordele van hierdie stelsel is dat die kapitaalkoste laag, die proses eenvoudig, en die reagensverbruik laag is. Die vernaamste nadeel van die stelsel is die stadige strooptempo.

Die *AARL-proses* wat deur Anglo American se navorsingslaboratoriums ontwikkel is,³ het twee stappe. In die eerste stap word die koolstof vooraf etlike ure lank onder druk by 'n temperatuur bo 115 °C geweek in 'n oplossing wat 1-5% natriumsianied en 1-5% natriumhidroksied bevat.

In die tweede stap word die koolstof 5 uur lank met vyf bedvolumes water, onder 'n druk van 50-100 kPa by 'n temperatuur hoër as 110 °C, met 'n vloeitempo van drie bedvolumes per uur geëluëer. Die voordele van hierdie

prosedure is dat die eluering vinnig plaasvind en dat die goudkonsentrasie in die eluaat hoog is, wat tot doeltreffende elektrolise lei. Die nadele van die prosedure is die behoefte aan water van 'n hoë gehalte, duurder toerusting as wat vir die Zadra-proses gebruik word, die behoefte aan sianied, en 'n hoër reagensverbruik.

Eluering met organiese oplosers

Die byvoeging van, byvoorbeeld, 'n 20%-oplossing van etanol by 'n bytsianiedeluant verhoog die elueertempo. Die eluering neem ongeveer 6 uur by atmosferiese druk en 80 °C. Die nadele sluit in hoër reagenskoste en hanteerprobleme met organiese oplosers.

Die *hoëdrukstrooppes* is soortgelyk aan die Zadra-proses behalwe dat eluering tot by 160 °C en onder druk van ongeveer 350 kPa uitgevoer word. Die voordele van hierdie proses is 'n laer reagensverbruik, 'n kleiner elueringsvoorraad en 'n kleiner elueerkring. Die nadele is duurder toerusting en die noodsaaklikheid vir die verkoeling van uitvloeioplossings om flitsing te voorkom.

Goudherwinning

Die goud word deur sinkpresipitasie of deur elektroherwinning uit die eluaat herwin. Daar is 'n aantal elektroëkstraksieselle ontwikkel.

Die silindriese Zadra-sel bestaan uit 'n silindriese kern (polipropileenmandjie) wat staalwol bevat en as die katode dien. Die anode (vlekvrye staal) omring die katode in die sel, en die eluaat word in die middel ingepomp.

Die sel wat die meeste gebruik word, is die *Mintek-sel*. Dit het 'n reghoekige konfigurasie met afwisselende parallelle anodes en katodes, soortgelyk aan dié in koperelektroëkstraksieselle. Die katodes is verwyderbare plastiekmandjies met geperforeerde kante wat vol staalwol gepak is. Die anodes is geperforeerde vlekvrystaalplate. Die vloei van die eluaat is parallel met die stroomvloei.

Die regenerering van die koolstof vind in twee stappe plaas:

- (1) 'n suurwas om die kalsiumkarbonaat en van die basismetale te verwyder, en
- (2) termiese reaktivering om organiese materiaal te verwyder en die poriestruktuur weer bloot te stel.

Die gelaaide koolstof word 6 uur lank by 20 °C tot 75 °C met 'n 5%-soutsuuroplossing gewas in 'n kolom wat van

Hastelloy of rubbergevoerde weekstaal gemaak is. Die koolstof word dan met natriumhidroksied geneutraliseer. Die suurwas kan voor of na die eluering plaasvind, maar dit word gewoonlik eerste gedoen omdat dit die doeltreffendheid van die eluering verhoog.

Tydens die termiese reaktivering neem die mate van aktivering toe met 'n verhoging in temperatuur en 'n langer verblyftyd, maar van die mikroporieë word vernietig as die toestand te straf is. Die reaktivering word tipies 10 min. lank by 700 °C uitgevoer. Lug moet tydens die regenerering uitgesluit word. Die stoom wat deur die koolstof ontwikkel word, is gewoonlik voldoende om die lug uit te sluit. Die geregenereerde koolstof word normaalweg afgekoel deur dit in water te blus.

Die regenerering vind gewoonlik plaas in 'n *draaioond* wat uitwendig verhit word deur elektriese weerstandsklos. Verhitting vind in die Minfurn-oond plaas deur 'n elektriese stroom in die aanwesigheid van stoom deur 'n laag voorafgedroogde koolstof te stuur.

Koolstof-in-loog-proses

Sommige ertse bevat koolstofhoudende materiaal wat effens aktief is en opgeloste goud kan adsorbeer. Hierdie koolstofhoudende materiaal word "pregrobers" genoem. Wanneer daar so 'n rower in 'n erts aanwesig is, word die koolstof-in-loog(KIL)-proses gebruik waarin die sianidiserig en koolstofadsorpsie in dieselfde reaktor plaasvind.

Die KIL-kring is soortgelyk aan 'n KIP-kring met die verblyftyd van die pulp as die vernaamste verskil. In die KIL-proses word die verblyftyd deur die tempo van goudoplossing bepaal en nie deur die tempo van goudadsorpsie soos in die KIP-proses nie. Daar word dus verblyf van 4 uur per stap gebruik. Die aanwesigheid van geaktiveerde koolstof verhinder die rower om goud te adsorbeer.

LITERATUURVERWYSINGS

1. Fivaz, C.E. (1988). How the MacArthur-Forrest Cyanidation Process Ensured South Africa's Golden Future, *J S Inst Min Metall*, 88, 9, 309-318.
2. Zadra, Z.D., Engel, A.L. & Heinen, H.J.(1952). Process for Recovering Gold and Silver from Activated Carbon by Leaching & Electrolysis, *US Bur Mines Rep RI 4843*.
3. Davidson, R.J. & Duncanson, D. (1977). The Elution of Gold from Activated Carbon using Deionized Water, *J S Inst Min Metall*, 77, 254-261.

Nuwe superharde dunlagiemateriale

P.L. Crouse

Departement Prosestegnologie, Atoomenergiekorporasie van Suid-Afrika Beperk, Posbus 582, Pretoria, 0001

Materiale wat tans as harde, beskermende deklages vir tribologiese toepassings gebruik word, is onder andere TiN, Ti_{1-x}Al_xN, ander vuurvaste nitriede, TiC, karbonitriede en boriede. Hulle word met 'n legio tegnieke gedeponeer. Hierdie tegnieke sluit chemiese dampdeponering, fisiese dampdeponering, laetemperatuurverstuwing, magnetrondeponering, holkatodeponering, opdamming en veel meer in. Kriteria vir sukses in die praktyk is: hoë hardheid, hoë styfheid, 'n lae wrywingskoeffisiënt en weerstand teen oksidasie in lug.

Hoewel daar steeds op hierdie materiale navorsing gedoen word, is hulle lank reeds geïndustrialiseer. Tipiese Vickers-hardhede wissel tussen 2 000 en 3 000 kg.mm⁻². TiN en TiC is in lug tot 500 °C teen oksidasie bestand, terwyl Ti_{1-x}Al_xN tot by 800 °C stabiel is. Ten spyte van die sukses van hierdie materiale is daar 'n toenemende aanvraag na dun lagies wat steeds beter presteer, wat Vickers-hardhede van meer as 4 000 kg.mm⁻² met 'n gepaardgaande hoë Young-modulus het, en wat voldoende oksidasiebestandheid toon. Die vernaamste kandidate tot dusver was kubiese boornitried (≤5 000 kg.mm⁻²) en diamant (~8 000 kg.mm⁻²). Mikro-kristallyne diamantlagies word reeds etlike jare suksesvol met 'n verskeidenheid tegnieke gedeponeer, maar daar bestaan inherente probleme met hierdie materiaal as gevolg van sy metastabiele aard en sy relatief swak oksidasiebestandheid. Hoewel daar reeds etlike snyprodukte met diamantlagies bemark word, is die jurie steeds uit wat betref die kommersiële sukses van hierdie produkte. Tipies word hulle tans ter wille van moontlike markpenetrasie teen 'n verlies verkoop.

Een aanvanklik belowende nuwe ontwikkeling op die gebied van superharde materiale was die onlangse voorspelling van Liu en Cohen¹ dat die hipotetiese verbinding, heksagonale β-C₃N₄, 'n hardheid soortgelyk of hoër as dié van diamant sou hê. Teen einde 1995 is daar egter nog steeds geen suksesvolle poging om kristallyne β-C₃N₄ te sintetiseer, gerapporteer nie. Tipiese CN-lagies wat wel gedeponeer² is, is amorf en het Vickers-hardhede van slegs 2 500 kg.mm⁻², ongeveer dieselfde as dié van amorfie gehidrogeneerde koolstof.

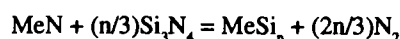
'n Heel unieke, en eksperimenteel bevestigde benadering het onlangs by die Tegnieke Universiteit van München die lig gesien. Stan Vepřek, hoof van die Instituut vir die Chemie van Inligting-opname, het in September 1995 by die 12de Internasionale Simposium oor Plasmachemie in Minnesota, VSA, 'n "nuwe era van superharde materiale" aangekondig. Hoewel sy uitlatings toe met meer as 'n knippie sout aangehoor is, het daar sedertdien 'n reeks bevestigende artikels oor dié onderwerp verskyn.^{3,4,5}

Die meganiese sterkte van materiale word deur die vorming en propagering van ontwrigtings en krake bepaal. Die spanning hiervoor benodig, word op sy beurt weer deur die elastiese modulus van die materiaal bepaal. Die presiese wiskundige verwantskap is 'n funksie van die aard van die ontwrigting, kraak en spanning. Oor die algemeen verhoog materiaalsterkte egter met groterwordende elastiese modulus. Vepřek en sy medewerkers het hul sintesefilosofie enersyds op die Hall-Petch-model gebaseer, wat verklaar waarom materiaalsterkte, addisioneel tot die genoemde modulusafhanklikheid, met kleinerwordende korrelgrootte verhoog. Andersyds word dit

teoreties deur die voorspelling van Koehler,⁶ dat verdere verhoging van materiaalsterkte by nanometerdik heterostrukture sou plaasvind, ondersteun. Volgens Koehler word kraak- en ontwrigtingspropagering by fasetussenvlakke gestuit.

Kortweg is Vepřek se benadering die volgende:

- Om die probleme verbonde aan die deponering van heterolagies te omseil, gebruik hy ternêre sisteme wat by die deponeringstemperatuur faseskeiding na twee afsonderlike binêre verbindings ondergaan. Hierdie ewewig word deur



gegeë. Me hier is 'n oorgangsmetaal, tipies Ti, Zr, Nb of W. By die toepaslike temperatuur en stikstof-parsiële druk lê die ewewig oor na links en faseskeiding vind tydens deponering binne die lagie plaas.

- Deur die temperatuur laag genoeg te hou, word tussen-diffusie geminimeer. Tussendiffusie lei tot 'n vervaging van die korrelgrense en gevolglik tot materiaalverswakking.
- Om die probleme verbonde aan roosterwanaanpassing te verslap, moet een van die fases verkieslik amorf wees. In die gerapporteerde gevalle is die silikonhoudende fase amorf.
- Die ander komponent moet kristallyn wees, met kristal-groottes in die nanometergebied, naby die stabiliteitsgrens van die kristallyne fase. In hierdie grootte kristalle is die ontwrigtingsdigtheid minimaal.

Resultate van sowel die Ti/Si/N- as die W/Si/N-sisteme is reeds gerapporteer. Afhangende van die deponeringsparameters is Vickers-hardhede van so hoog as 6 000 kg.mm⁻² behaal. Verder is die elastiese modulus van hierdie saamgestelde materiale groter as dié van die suiwer verbindings en is hulle oksidasiebestand in lug tot by 800 °C.

Deponering is tot dusver met 'n relatief eenvoudige radiofrekwensiegebaseerde plasmadeponeringstegniek uitgevoer, gebruikmakend van TiCl₄ of WF₆, SiH₄ en N₂ as uitgangstowwe. Of die deponeringsfilosofie na ander tegnieke oordraagbaar is, moet nog bevestig word. Daar is wel tekens dat dit tot plasmaverwante tegnieke beperk mag wees.

LITERATUURVERWYSINGS

1. Liu, A.Y. & Cohen, M.L. (1989). Prediction of new low compressibility solids, *Science*, **245**, 841-842.
2. Vepřek, S., Weidman, J. & Glatz, F. (1995). Plasma chemical vapor deposition and properties of hard C₃N₄ thin films, *J. Vac. Sci. Technol. A*, **13**(6), 2914-2919.
3. Vepřek, S. & Reiprich, S. (1995). A concept for the design of novel superhard coatings, *Thin Solid Films*, **268**, 64-71.
4. Vepřek, S., Reiprich, S. & Shizhi L. (1995). Superhard nanocrystalline composite materials: the TiN/Si₃N₄ system, *Appl. Phys. Lett.*, **66**, 2640-2642.
5. Vepřek, S., Haussmann, M. & Reiprich, S. (1995). Superhard nanocrystalline W₂N/amorphous Si₃N₄ composite materials, *J. Vac. Sci. Technol. A*, **14**(1), 46-51.
6. Koehler, J.S. (1970). Attempt to design a strong solid, *Phys. Rev. B*, **2**(2), 547-551.

PROEFSKRIFTE EN VERHANDELINGS

Koregulering van styselafbraak en dimorfisme in die gis *Saccharomyces cerevisiae**

M.G. Lambrechts

Departement Mikrobiologie en Instituut vir Wynbiotegnologie, Fakulteit Landbouwetenskappe, Universiteit van Stellenbosch, Privaat sak X1, Matieland, 7602

Styselbenutting in die gis *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (voorheen *S. diastaticus*) berus op die teenwoordigheid van een van drie homoloë gene, *STA1* (chr. IV), *STA2* (chr. II) en *STA3* (chr. XIV), wat onderskeidelik vir die ekstrasellulêre, geglikosileerde glukoamilase-isoëieme GAI, GAI en GAIII kodeer. Hierdie gene ontbreek in *S. cerevisiae*, maar 'n verwante geen, *SGA1* (chr. IX), wat vir 'n intrasellulêre, sporulasie-spesifieke glukoamilase kodeer (*SGA1*), word in sowel *S. cerevisiae* as *S. cerevisiae* var. *diastaticus* gevind. Twee bykomende DNA-volgordes, *S1* en *S2*, wat in verskeie *S. cerevisiae*-rasse teenwoordig is, is homoloog aan die 5'-gebied van die *STA1-3*-gene. Na aanleiding van die nukleotiedvolgordes van *STA1*, *STA2*, *SGA1*, *S1* en *S2* wil dit voorkom asof *STA1* en *STA2* (en moontlik *STA3*) vir identiese glukoamilases kodeer, terwyl *S2*, *S1* en *SGA1* onderskeidelik vir die volgende komponente van die *STA1-3*-gene kodeer: 'n hidrofobiese leiervolgorde vir proteïensekresie, 'n treonien/serienryke domein wat moontlik stysel bind en 'n katalitiese domein wat vir glukoamilaseaktiwiteit verantwoordelik is. Alhoewel *S2* oorsprong gee aan 'n 4.2 kilobasisse (kb)-transkrip en die DNA-volgorde stroomop van *S2* homoloog is aan die promotorvolgordes van die *STA1-3*-gene, is die funksie van *S2* nog onbekend. Verskeie bevindinge dui daarop dat die evolusie van 'n ouerlike *STA*-geen vanaf opeenvolgende versmeltings tussen *S2*, *S1* en *SGA1* redelik onlangs plaasgevind het.

Die sintese van *SGA1* word positief gereguleer deur asetaat, *SME2* en *SME3*, gene wat meiose induseer (*IME1* en *IME2*) en paringstipegene (*MATa1* en *MAT α 2*), en negatief deur 'n repressorgeen van meiose (*RME1*) en ander voedingseine (stikstof en glukose). Die teenwoordigheid van die *GAM1*- (*SNF2*), *GAM2*- (*RPD1*), *GAM3*- (*ADR6*), *SNF1*-, *SNF5*-, *SNF6*- en *HAF2*-gene reguleer die *STA1-3*-gene positief. Die *STA1-3*-gene word ook op verskeie vlakke negatief gereguleer; geenuitdrukking word verminder in vloeibare sintetiese media (pH verwant), is onderworpe aan katabolietonderdrukking deur glukose en word in respiratories-gebreklike mutante geïnhibeer. Uitdrukking van die *STA1-3*-gene word verminder deur die *MATa1/MAT α 2*-gekodeerde repressor in die meeste, maar nie alle α/α -diploïede nie. Verder bevat die meeste rasse van *S. cerevisiae* die *STA10*-geen, wat die uitdrukking van glukoamilase volgens 'n ongedefinieerde meganisme met minstens 20 keer verminder. Die *STA10*-geen word nie in rasse van *S. cerevisiae* var. *diastaticus* aangetref nie en gevolglik word die *STA1-3*-gene uitgedruk. Twee ander lokusse, *SNS1* en *MSS1*, is betrokke by die *STA10*-afhanklike onderdrukking van die *STA1-3*-gene. Daar is ook waargeneem dat styselafbrekende gisrasse sterk pseudohifedifferensiasie

ondergaan, wat geassosieer word met penetrerende groei tydens groei op styselbevattende media.

Die doel van hierdie studie is: (i) om die *cis*-werkende volgordes in die *STA2*-promotor wat by die positiewe en negatiewe regulering van glukoamilaseuitdrukking in *S. cerevisiae* betrokke is, te bepaal, (ii) om die meganisme te ontrafel waarvolgens glukoamilasesintese deur *STA10* onderdruk word, en (iii) om die funksie van die *S1*- en *S2*-gebiede te bepaal om sodoende lig te werp op die regulering van die *STA1-3*-gene.

Opeenvolgende en interne delesies in die promotorgebied van *STA2* is gekonstrueer om vas te stel of daar moontlike stroomop-aktiveringsetels en *cis*-werkende teikenvolgordes vir *STA10* en *MATa1/MAT α 2* voorkom. Twee stroomop-aktiveringsgebiede (UAS'e), drie *STA10*-afhanklike repressorgebiede (URS'e), asook twee gebiede vir remmende regulering van *STA2*-uitdrukking is geïdentifiseer. *MATa1/MAT α 2*-onderdrukking beïnvloed *STA2*-uitdrukking óf stroomaf van die translasië-inisiasiepunt óf indirek, aangesien geen funksionele $\alpha1/\alpha2$ -afhanklike volgorde in die promotorgebied geïdentifiseer kon word nie. Een van die UAS'e is óf aangrensend óf oorvleuel met een van *STA10* se URS'e.

'n Multikopie-genoombiblioteek is gekonstrueer om *STA10*-onderdrukking te bestudeer. Gene wat die groei van *S. cerevisiae*-selle op styselmedia in die teenwoordigheid van *STA10* bevorder, is hieruit geselekteer. 'n Multikopie-suppressorgeen van die *STA10*-fenotipe, naamlik *MSS10* (multikopie suppressor van *STA10*), is gedurende die studie gekloneer, waarna dit gekarteer en die DNA-volgorde bepaal is. Hierdie geen is op chromosoom XV geleë en is homoloog aan drie ander gene van *S. cerevisiae*, naamlik *FUP1* ('n versterker van ysterbeperkende groei), *MSN1* ('n aktiveerder van invertase-uitdrukking) en *PHD2* ('n induseerder van pseudohifegroei tydens stikstofbeperking). *MSS10* kodeer vir 'n transkripsionele aktiveerder van 382-aminosure. *MSS10* aktiveer die *STA2*-geen en oorkom *STA10*-onderdrukking wanneer dit op 'n multikopie-plasmied teenwoordig is. Die verskillende fenotipes wat met die oordrukking van *MSS10* geassosieer word, dui daarop dat *Mss10* betrokke is by die regulering van 'n algemene respons tydens verskillende voedingbeperkings.

Om die verwantskap tussen styselafbraak en pseudohifegroei (seldifferensiasie) in *S. cerevisiae* te ontrafel en die funksie van die *S1*- en *S2*-gebiede te bepaal, is gis-inleikloonmembrane gebruik om *SGA1*, *S1* en *S2* te karteer. *SGA1* is op die linkerarm van chromosoom X, terwyl *S1* en *S2* aangrensend op die regterarm van chromosoom IX geleë is. Die gebied wat *S1* en *S2* bevat, is gekloneer en die nukleotiedvolgorde is bepaal. Een oop leesraam van 4101

* Proefskrif vir die graad Ph.D.Agric.; promotor - prof. I.S. Pretorius

basispare (bp) is in hierdie nukleotiedvolgorde teenwoordig. Hierdie ooppleesraam toon homologie met verskeie mukinproteïene wat in soogdiere teenwoordig is, en is daarom "MUC1" genoem. Hierdie proteïene van 1367 aminosure, wat verskeie serien/treonieryke herhalings bevat, is 'n potensieël integrale membraangebode proteïene. Dit stem ooreen met mukinagtige membraanproteïene van soogdiere wat moontlik 'n rol speel in die vermoë van kankerselle om ander weefsel te penetreer.

Vervolgens is die uitwerking van die *MSS10*-geen op pseudohifegroei en styselafbraak ondersoek. Resultate het getoon dat haploïede selle van styselafbrekende rasse 'n pseudohifedifferensiasie vertoon wat nie van dié van diploïede selle onderskei kan word nie. 'n Delesiemutant van *MSS10* vertoon verminderde pseudohifedifferensiasie en penetrerende groei, waarteenoor 'n delesie van die *MUC1*-geen die algehele afwesigheid van pseudohifedifferensiasie en penetrerende groei veroorsaak. *MUC1* word, net soos die *STA1-3*-gene, ook deur *MSS10* geaktiveer. Dit wil voorkom asof *Mss10* 'n transkripsionele aktiveerder is wat spesifiek reageer tydens voedingsbronbeperkings in die algemeen en dat dit die uitdrukking van *MUC1*- en die *STA1-3*-gene ko-reguleer. Induksie van pseudohifegroei deur *MSS10* is nie gebaseer op die regulering van die *STA1-3*-gene nie; *Mss10*

moet dus pseudohifedifferensiasie via ander gene of faktore reguleer. Dit wil voorkom asof sowel *MSS10* as *MUC1* ook 'n rol speel by die flokkulasie van selle.

Gesamentlike regulering van styselafbraak en pseudohifedifferensiasie is in pas met die gepostuleerde rol van die pseudohifegroeiproses; dit stel dus die gis in staat om vir voedingstowwe te soek. Die rol van die ko-regulering kan op twee maniere vertolk word: ener syds kan die induksie van die *STA1-3*-gene tydens voedingsbronbeperkings, meer spesifiek koolstofbeperking, verklaar word deur die behoefte om stysel as 'n nuwe koolstofbron te benut; andersyds dui die relatiewe oneffektiwiteit waarmee die *STA1-3* se geenprodukte stysel benut op 'n alternatiewe teorie. Die moontlikheid bestaan dat die *STA1-3*-gene in *S. cerevisiae* geïnduseer word om die penetrasie van polisakkariedryke substrate in die natuurlike omgewing moontlik te maak en sodoende polisakkariedbevattende versperrings te oorkruis. Die induksie van die *STA1-3*-gene se primêre doel is nie om stysel as koolstofbron te kan benut nie, maar eerder om net voldoende polisakkariedversperring af te breek sodat die pseudohife na 'n nuwe voedingsryke kompartement kan deurbeweeg. Hierdie hipotese stel voor dat die funksie van die *STA1-3*- en *MUC1*-gene gekoppel is, wat ook verklaar hoekom die gene gesamentlik gereguleer word.

Genetiese, fisiese en biochemiese karakterisering van die *Lipomyces kononenkoe* α -amilase uitgedruk in *Saccharomyces cerevisiae**

A.J.C. Steyn

Departement Mikrobiologie en Instituut vir Wynbiotegnologie, Fakulteit Landbouwetenskappe, Universiteit van Stellenbosch, Privaat sak X1, Matieland, 7602

Stysel is 'n belangrike hernieubare biologiese hulpbron en bestaan uit 20-30% lineêre (amilose) en 70-80% vertakte (amilopektien) glukosepolimere. Die eerste stap in die hidrolise van rou stysel behels die verbrokkeling van die styselgranules tydens gelatinisering. Na afloop van die kookproses word die styselpap deur α -amilase (EC 3.2.1.1) vervloei en daarna deur glukoaamilase (EC 3.2.1.3) en 'n onttakkingsensiem (bv. isoamilase, EC 3.2.1.68) versuiker.

Lipomyces kononenkoe skei 'n hoogs effektiewe α -amilase, glukoaamilase, isoamilase en siklodekstrien-glukanotransferase uit en is daarom een van die doeltreffendste rou-styselafbrekende giste bekend. *L. kononenkoe* kan egter nie weens sy lae etanoltoleransie, stadige groeitempo, katabolietonderdrukking, swak gekarakteriseerde genetica en gebrek aan ABAV (Algemeen Beskou As Veilig)-status in bestaande industriële fermentasies aangewend word nie. 'n Geneties gemanipuleerde ras van *Saccharomyces cerevisiae* wat hierdie amilasegene van *L. kononenkoe* kan uitdruk, kan waardevol wees in die produksie van brandstofetanol, drinkbare alkohol, enkelselproteïene, probiotika en maltosestroppe vanaf styselryke

landbougewasse en afval.

Die doel van dié studie was om 'n rou-styselafbrekende α -amilase (*LKA1*) uit 'n nie-katabolietonderdrukte mutant (IGC4052B) van *L. kononenkoe* te suiwer en te karakteriseer, om hierdie α -amilase se geen (*LKA1*) te kloneer, karakteriseer en karteer, en om *LKA1* in *S. cerevisiae* uit te druk. Dit is die eerste molekulêr-genetiese studie op die oergisfamilie Lipomycetaceae.

Die α -amilase wat deur *L. kononenkoe* IGC4052B uitgeskei word, is deur middel van ammoniumsulfaat-fraksionering en ioon-uitruilingschromatografie tot homogeniteit gesuiwer. Daar is vasgestel dat die ensiemgrootte 76250 Da is. Ontleding van die eindproduk deur hoëdruk-vloeistofchromatografie (HPLC) het aangedui dat *L. kononenkoe* se α -amilase deur endohidrolise funksioneer om sodoende hoofsaaklik maltose, maltotriose en maltotetraose te produseer. Die K_m -waardes vir stysel en amilopektien was onderskeidelik 2.32 en 1.97. Die volgende N-terminale aminosure is vir die gesuiwerde ensiem bepaal: Asp-Cys-Thr-Thr-Val-Thr-Val-Leu-Ser-Ser-Pro-Glu-Ser-Val-Thr-Gly.

* Proefskrif vir die graad Ph.D.Agric.; promotor - prof. I.S. Pretorius

'n cDNA (deoksiribonukleïensuur komplementêr tot ribonukleïensuur)-biblioteek is in 'n gisekspressievektor, wat 5×10^5 individuele klone met 'n gemiddelde invoegingsgrootte van 1400 basispare (bp) verteenwoordig, opgestel. Die transformasie van *S. cerevisiae* YPH259 en die daaropvolgende direkte seleksie van transformante op minimale medium bevattende Phadebas-stysel, het gelei tot die opsporing van verskeie kolonies wat α -amilase uitskei. Die *LKA1* (*Lipomyces kononenkoae* α -amilase)-geen wat vir hierdie industrieel belangrike α -amilase kodeer, is as 'n 2261 bp-cDNA-fragment gekloneer. Die nukleotiedvolgorde van die cDNA-fragment is bepaal en daar is bevind dat dit 'n ooplesraam van 1872 bp bevat, wat vir 'n 596-aminosuur volwasse proteïen (LKA1) met 'n berekende molekulêre massa van 65706 kodeer. Homologiestudies met ander amilases se aminosuurvolgordes het getoon dat LKA1 ook die vier gekonserveerde areas wat kenmerkend van die α -amilaseproteïenfamilie is, bevat, nl: (A) ²⁶⁴DIVVNH²⁶⁹, (B) ³⁴⁹GLRIDTVKH³⁵⁷, (B') ³⁷⁶GEVFD³⁸⁰ en (C) ⁴³⁹FLENQD⁴⁴⁴. Die cDNA-kopie van *LKA1* is onder die beheer van *S. cerevisiae* se fosfoliseraatkinase-geenpromotor (*PGK1*) geplaas en Northern-kladanalise het die teenwoordigheid van 'n enkele 2.3 kb-transkrip aangetoon. Die 28-aminosuur-seinpeptied van LKA1 in *S. cerevisiae* en *Schizosaccharomyces pombe* het tot die effektiewe uitskeiding daarvan in die medium gelei. Zimogramanalise het daarop gedui dat glikosilering van die proteïen in *S. cerevisiae* 'n negatiewe effek op die ensiemaktiwiteit het.

'n *L. kononenkoae* IGC4052B-kosmiedbiblioteek, wat 8500 verskillende klone met 'n gemiddelde invoegingsgrootte van 30 kilobasisse (kb) verteenwoordig, is opgestel. Kolonieklaadhibridisasie is gebruik om kosmiedklone bevattende *LKA1* te identifiseer. Die transformasie van *S. cerevisiae* met 'n kosmiedkloon bevattende die vollengte *LKA1*-geen en -promotor het nie tot transformante wat α -amilase uitskei, gelei nie. In teenstelling hiermee, het die klonering van die *LKA1*-promotor stroomop van die cDNA-kopie van *LKA1* en die daaropvolgende transformasie van

S. cerevisiae tot die konstitutiewe produksie van α -amilase op minimale medium bevattende glukose gelei. Ontleding van die nukleotiedvolgorde van *LKA1* se promotorgebied het getoon dat daar volgordes voorkom wat met die TATAA-, CAAT- en CCAAT-volgordes, asook die GCN4-bindingsetels van promotors in *S. cerevisiae* ooreenstem. Inleierverlengingsanalise in *L. kononenkoae* het twee hoof transkripsie-inisiëringsetels by nukleotiede -64 en -65 aangetoon, en verskeie minder belangrike inisiëringsetels tussen nukleotiede -44 en -80. Daar is van die polimera-seketteringreaksie (PKR)-tegniek en verskeie kombinasies van inleiers gebruik gemaak om die vollengte genoomkopie van *LKA1* vanaf 'n kosmiedkloon te vermeerder, en tussen *S. cerevisiae* se *PGK1*-promotor en -termineerder te plaas. Weens die teenwoordigheid van 'n 61 bp-intron in die genoomkopie van *LKA1* het *S. cerevisiae*- en *Schiz. pombe*-transformante wat hierdie konstruksie bevat het, nie biologies-aktiewe α -amilase geproduseer nie. Die 5'-splitslasetel (skenkerasetel; 5'-GTATGC-3'), 3'-splitslasetel (ontvangerasetel; 5'-CAGTGC-3') en vertakkingsasetel (5'-AACTGAC-3'), teenwoordig in *LKA1* se intron, stem ooreen met die konsensusvolgordes wat in die introns van *Schiz. pombe* en soogdierselle voorkom. Nogtans was *Schiz. pombe* nie in staat om *LKA1* se intron korrek te prosesseer en biologies aktiewe α -amilase te produseer nie. Voorts is daar met behulp van die pulsveldjielektroforese (CHEF)-analise vasgestel dat daar minstens agt chromosome is waarvan die grootte tussen 0,875 en 2,2 megabasisse (Mb) varieer. Met behulp van chromokladanalise is ook bepaal dat die *LKA1*-geen op chromosoom II geleë is.

LKA1 is die eerste geen van die Lipomycetaceae wat gekloneer, gekarakteriseer, gekarteer en in *S. cerevisiae* uitgedruk is. Dié studie sal dus 'n belangrike bydrae lewer om die molekulêre aard van geenuitdrukking en proteïenuitskeiding in Lipomycetaceae te ontrafel. Dit sal ook die weg baan vir die konstruksie van doeltreffende roustyselafbrekende rasse van *S. cerevisiae* vir eenstap-bio-omsetting van stysel na kommersieel belangrike kommoditeite.

Uitdrukking en regulering van protease-gekodeerde gene in *Saccharomyces cerevisiae**

K. Lourens

Departement Mikrobiologie en Instituut vir Wynbiotegnologie, Fakulteit Landbouwetenskappe, Universiteit van Stellenbosch, Privaat sak X1, Matieland, 7602

Proteïenonstabiliteit word geassosieer met die meeste wit druiensoorte. Daar is geen direkte verband tussen proteïenonstabiliteit en die totale proteïeninhoud van 'n wyn nie, maar eerder tussen proteïenonstabiliteit en 'n sekere fraksie van die totale proteïeninhoud. Indien 'n wyn wat hierdie proteïenfraksie bevat nie behandel word voor bottelering nie, kan die proteïene denatureer of presipiteer as gevolg van ongunstige opbergings toestande en 'n sigbare sediment in die wyn vorm. Tans word bentoniet in die wynindustrie gebruik om onstabiele proteïene uit wyn te verwyder voordat

dit gebotteleer word. Die gebruik van bentoniet hou egter heelwat nadele vir die wyn in, o.a. die verwydering van sekere belangrike geur- en aromakomponente. Die gebruik van suur proteases is as alternatief vir die gebruik van bentoniet voorgestel.

Saccharomyces cerevisiae produseer geen ekstrasellulêre proteolitiese ensieme nie. Dit produseer egter heelwat intrasellulêre proteases wat normaalweg in die vakuool voorkom en kan hierdie proteases vrystel tydens gisoutlase as gevolg van 'n voedingstoftekort. Daar is gevind dat indien

* *Verhandeling vir die graad M.Sc.; studieleier - prof. I.S. Pretorius*

wyn in kontak gehou word met die gismoer na die voltooiing van die alkoholiese fermentasie, dit meer proteïenstabiel is as wyn wat onmiddellik van die moer verwyder word. Hierdie bevinding kan toegeskryf word aan die ensiematiese werking van proteïenase A (PrA), die enigste suur protease wat in die gisvakuool voorkom.

PrA word in *S. cerevisiae* as 'n voorloperproteïen of 'n sogenaamde preproteïen gesintetiseer. Die prepeptied word vroeg reeds in die uitskeidingsweg verwyder en die propeptied word verwyder soos wat die proteïen die vakuool binnegaan. Die propeptied bevat die inligting wat die protease na die vakuool lei en hou ook die protease onaktief tydens die vervoer na die vakuool. Die geen wat vir PrA kodeer, *PEP4*, is gekloneer en onder verskeie promotor-, leier- en terminasievorgordes uitgedruk. Die *PEP4*-geen se eie promotor (*PEP4_p*), alkoholdehidrogenase se geenpromotor (*ADH1_p*) en die fosfogliseraatkinase se geenpromotor (*PGK1_p*) is in hierdie konstruksies gebruik. Termineerders is vanaf die *PEP4*-geentermineerder (*PEP4_t*) en die fosfogliseraatkinase termineerder (*PGK1_t*) verkry. Die sekresiesein van die gisferomoon- α -faktor (*MF α _s*) is gebruik om die leiervolgorde van die *PEP4*-geen te vervang in sekere van die konstruksies. Die vyf verskillende konstruksies, *PEP4_p-preproPEP4-PEP4_t*, *ADH1_p-preproPEP4-PEP4_t*, *PGK1_p-preproPEP4-PEP4_t*, *PGK1_t*, *ADH1_p-MF α _s-preproPEP4-PEP4_t* en *ADH1_p-MF α _s-PEP4-PEP4_t* is in

laboratoriumrasse van *S. cerevisiae* getransformeer. Giste wat met die eerste drie plasmiede getransformeer is, het sones op kaseïen-bevattende agarplate gevorm. Giste wat met die laaste twee plasmiede getransformeer is, het geen protease-aktiwiteit getoon nie. Om die seleksie van gistransformante in die afwesigheid van ouksotrofiëse merkers te vergemaklik, is die rekombinante episomale plasmied bevattende die *ADH1_p-preproPEP4-PEP4_t* ekspressiekasset met die dominant-selekteerbare Genetisien-G418-bestandheidsmerker (Gt^R) toegerus. Hierin word *APH1* onder beheer van die promotor van die induseerbare uridiendifosfoglukose-4-epimerasegeen (*GAL10_p*) en die gis-orotidien-5'-fosfaatkarboksiliase-geentermineerder (*URA3_p*) uitgedruk. Transformasie van hierdie plasmied in 'n wyngis het die sintese van *PEP4*-transkripte asook die produksie van ekstrasellulêre biologies-aktiewe PrA tot gevolg gehad. Hierdie rekombinante wyngis was instaat om kaseïen doeltreffend af te breek. 'n Gis-integreringsplasmied is ook gekonstrueer bevattende die *ADH1_p-preproPEP4-PEP4_t* ekspressiekasset en die Genetisien-bestandheidsmerker en sal nou in 'n wyngis getransformeer word. Om multikopie-integrering te bewerkstellig, is die integreringsplasmied met die 5S ribosomale DNA-volgorde van gis toegerus. Toekomstige werk behels die evaluering van die rekombinante wyngiste wat PrA uitskei en die effektiwiteit daarvan om potensieel onstabiele proteïene uit wyn te verwyder.

Molekulêre klonering, karakterisering en uitdrukking van twee β -xylanasegekodeerde gene van die fungus *Aspergillus niger* in die gis *Saccharomyces cerevisiae**

M. Luttig

Departement Mikrobiologie, Fakulteit Landbouwetenskappe, Universiteit van Stellenbosch, Privaat sak X1, Matieland, 7602

Plantselwande, die hoof polisakkariëbevattende hernubare bron in die natuur, bestaan uit sellulose, hemisellulose en lignien. Hemisellulose bestaan uit 'n reeks heteropolisakkarië wat glukane, mannane, arabinane en xilane insluit. Xilane vorm die meerderheid van die heteropolimere en bestaan uit 'n β -D-1,4-gekoppelde xilopiranosiedruggraat. Die xilaanpolimeer kan gesubstitueer word met asietielresidu's, en residu's van arabinose en metielglukuroonsuur. Feruliese suur- en *p*-coumariese suurreidu's kan aan die arabinoseresidu's gekoppel wees deur middel van ester-koppelingen, afhangend van die plant van oorsprong. Volledige afbraak van só 'n komplekse struktuur vereis die werking van 'n aantal hidrolitiese ensieme. Die kritiese ensiem om xilaan te polimeriseer, is endo-1,4- β -xylanase, wat die hoofketting afbreek om nie-vertakte of vertakte xilooligosakkarië te vorm. Die hoofkettingvertakkings word deur die ooreenkomstige glikosidasas of esterases soos volg vrygestel: α -L-arabinosielresidu's deur α -L-arabinofuranosidase; 4-O-metiel-D-glukuronosielresidu's of D-glukuro-

nosielresidu's deur α -glukuronidase; asynsuur-, *p*-coumariese suur- en feruliese suurreidu's onderskeidelik deur asietielxilaanesterase, *p*-coumaroïelesterase en feruloïelesterase. Die xilanolitiese ensieme is uit verskeie bakterieë en fungi, insluitende *Aspergillus niger* geïsoleer.

Die gis *Saccharomyces cerevisiae* word wyd algemeen vir die produksie van etanol (drink- en vlambare alkohole) en enkelselproteïen (proteïenaanvullings in voedsel en diervoer) gebruik en geniet GRAS ("Generally Regarded As Safe") status. *S. cerevisiae* kan egter nie komplekse polisakkarië, insluitend xilaan, benut of afbreek nie. Die doel van hierdie studie was die klonering, uitdrukking en karakterisering van twee *Aspergillus niger* β -xylanasekoderende gene in *S. cerevisiae* om sodoende die gis in staat te stel om xilaan gedeeltelik af te breek. Die uitskeiding van sellulasevrye endoxilanases deur rekombinante *S. cerevisiae*-stamme het verskeie toepassingsmoontlikhede in die papier- en pulpbedryf, diervoeding en in die voedselbedryf.

Komplementêre DNA (cDNA)-kopieë van die *xynC* en

* *Verhandeling vir die graad M.Sc.; studieleier - prof. W.H. van Zyl*

xlnA endo-1,4- β -xylanasegene van *A. niger* ATCC 90196 is gekloneer, gekarakteriseer en in *S. cerevisiae* uitgedruk. Poli(A)⁺mRNA is vanaf *A. niger* geïsoleer en eerstestring-cDNA is voorberei. Die cDNA-kopieë van die *xynC*- en *xlnA*-gene is deur die polimerasekettingreaksie (PKR)-tegniek geamplifiseer deur van geenspesifieke passtuk-inleiers gebruik te maak en as 'n 650 bp- en 671 bp-*EcoRI/XhoI*-fragment onderskeidelik geïsoleer. Die twee strukturele gene is afsonderlik tussen die induiseerbare alkoholdehidrogenase II-promotor- (*ADH2_p*) en termineringsekvens (*ADH2_t*) in die multikopie gis episomale plasmied pDLG1 ingevoeg en na die laboratoriumstam *S. cerevisiae*-Y294 oorgedra. Die *ADH2_p-xynC-ADH2_t*- en *ADH2_p-xlnA-ADH2_t*-geenkonstrukte is onderskeidelik *XYN4* en *XYN5* genoem. Die gistransformante wat die *XYN4*- en *XYN5*-gene bevat het, het sigbare sones op "Remazol Brilliant Blue"-xilaanagar-plate geproduseer.

Die natuurlike leierpeptiede van die rekombinante proteïene Xyn4 en Xyn5 is skynbaar deur *S. cerevisiae* as sekresieseïene erken en deur die *KEX2*-protease geknip om die produksie en uitskeiding te laat geskied. Die nukleotiedvolgordes van die *XYN4*- en *XYN5*-gene is bepaal en daar is bevind dat beide gene 'n 636 bp-oopleesraam bevat wat vir 'n 211-aminosuurpropeptied kodeer. Die nukleotied- en

afgeleide aminosuuropeenvolgings van die *XYN4*- en *XYN5*-gene was onderskeidelik 90% en 92% identies aan mekaar. Natriumdodesiesulfaat-poliakrielamied-jelelektroforese (SDS-PAGE) van proteïenfraksies vanaf die Xyn4- en Xyn5-produiserende *S. cerevisiae*-rasse het 'n 30 kDa-proteïenspesie vir beide β -xilanasese getoon. Die teoretiese molekulêre massas van die volwasse 184 aminosuurlange Xyn4- en Xyn5-poli-peptiede is 19,9 en 20,0 kDa onderskeidelik, wat daarop dui dat hiperglikosilering plaasgevind het. Daar is bepaal dat die temperatuur- en pH-optima van beide β -xilanasese 60 °C en pH 4 is. Bogenoemde data dui dalk op die moontlikheid dat die *XYN4*- en *XYN5*-gene vir twee isomeriese β -xilanasese van *A. niger* ATCC 90196 kodeer.

Otoselektiewe β -xilanaseproduserende rasse van *S. cerevisiae* is gekonstrueer deur die *FUR1*-geen op die genoom van die rekombinante giste met die *LEU2*-geen te onderbreek om sodoende 'n *fur1::LEU2 XYN4*- en *fur1::LEU2 XYN4*-rasse onderskeidelik te lewer. Dit het verseker dat plasmiedseleksie in ryk medium behou is. Hoër β -xilanasese-aktiwiteit is in rykmedium teenoor selektiewe sintetiese (SC) medium verkry. Die totale Xyn4-aktiwiteit (91 nkat ml⁻¹) was hoër as dié van Xyn5 (73 nkat ml⁻¹) in ryk medium, maar aansienlik laer as die 550 nkat ml⁻¹ β -xilanasese-aktiwiteit wat vir *A. niger* in ryk medium waargeneem is.

Biotipiese karakterisering van spesiekomplekse binne *Cylindrocladiella* en *cylindrocladium**

D. Victor

Departement Mikrobiologie en Plantpatologie, Fakulteit Landbouwetenskappe, Universiteit van Stellenbosch, Privaat sak X1, Matieland, 7602

Tydens die primêre gisting van wyn word suikers in druiwemos deur rasse van *Saccharomyces cerevisiae* na etanol, koolsuurgas en geurstowwe gefermenteer. In die sekondêre appelmelksuurgisting word L-appelsuur na L(+)-melksuur gedekarboksileer deur melksuurbakterieë, veral geselekteerde rasse van *Leuconostoc oenos*. Hierdie ontsuring van wyn is van groot tegnologiese belang vir wynkelders. Die appelmelksuurgisting is eger 'n moeilike gisting om te beheer, aangesien melksuurbakterieë sensitief vir hoë etanol- en swaweldioksiedkonsentrasies is. Daar is ook beperkte voedingstowwe beskikbaar vir die groei van appelmelksuur *S. cerevisiae* kan nie malaat effektief by wyn-pH afbreek nie. Daarteenoor kan die gis *Schizosaccharomyces pombe* malaat volledig in die teenwoordigheid van 'n assimileerbare koolstofbron dekarboksileer. Kinetiese studies het aangetoon dat L-malaat deur 'n aktiewe transportsisteen in *S. pombe* opgeneem word. Suksien-, D-appel-, fumaar-, oksaalasyn-, α -peterende inhibitors van L-malaattransport in *S. pombe* op.

Die malaatpermease-geen (*mae1*) van *S. pombe* is deur middel van komplementering van 'n transportmutant met 'n *S. pombe* *Sau3A*-genoombiblioteek gekloneer. Twee oopleesrame is op die 5,7 kb-DNA-fragment gevind. Die eerste oopleesraam kodeer vir 'n proteïen (*mae1p*) met 'n

afgeleide molekulêre massa van ongeveer 49 kDa. Die wateraffiniteitsprofiel van die afgeleide aminosuurovolgorde toon 'n proteïen met hidrofiliese N- en C-termini, en 10 transmembraan- of geassosieerde domeine, wat tipies van transportproteïene is. Met behulp van gerekenariseerde analiese is verskeie gekonserveerde motiewe in die primêre volgorde van die *mae1p* herken. 'n Gekonserveerde PEST-gebied en 'n leusienritssluit, bestaande uit vier leusienresidu's elk deur ses aminosure gespaseer, is geïdentifiseer. Die proteïen bevat ook verskeie N-glikosileringsetels. Komplementering van die malaatpermeasemutant met die *mae1*-fragment het gelei tot die volle herstel van malaat- en suksinaattransport. 'n Prominente TATAT-sekwensie, wat vier keer herhaal word, is -66 tot -87 bp stroomop van die ATG-kodon gelokaliseer. 'n Direkte 10 bp-herhaling, TCATTTTTTA, wat deur 9 bp geskei word, is -194 tot -203, en -213 tot -222 bp stroomop van die ATG-kodon gevind. Met behulp van die chromokladtegniek is vasgestel dat die *mae1*-geen op chromosoom 1 geleë is. Noordelike kladanalise het aangetoon dat die *mae1*-geen konstitutief uitgedruk word en nie onderworpe aan katabolietonderdrukking is nie, soos wat die geval vir die gene van die malaatsisteen van *Candida utilis* en *Hansenula anomala* is.

* Proefskrif vir die graad Ph.D.Agric.; promotor - prof. I.S. Pretorius

Die *mae1*-geen van *Schizosaccharomyces pombe* kodeer vir 'n permease vir malaat en ander C₄-dikarboksielsure*

J. Grobler

Departement Mikrobiologie, Fakulteit Landbouwetenskappe, Universiteit van Stellenbosch, Privaat sak X1, Matieland, 7602

Tydens die primêre gisting van wyn word suikers in druiwemos deur rasse van *Saccharomyces cerevisiae* na etanol, kooldioksied en geurstowwe gefermenteer. In die sekondêre appelmelksuurgisting word L-appelsuur na L(+)-melksuur gedekarboksileer deur melksuurbakterieë, veral geselekteerde rasse van *Leuconostoc oenos*. Hierdie ontsuring van wyn is van groot tegnologiese belang vir wynkelders. Die appelmelksuurgisting is eger 'n moeilike gisting om te beheer, aangesien melksuurbakterieë sensitief vir hoë etanol- en swaweldioksiedkonsentrasies is. Daar is ook beperkte voedingstowwe beskikbaar vir die groei van appelmelksuurbakterieë aan die einde van die alkoholiese gisting. Rasse van *S. cerevisiae* kan nie malaat effektief by wyn-pH afbreek nie. Daarteenoor kan die gis *Schizosaccharomyces pombe* malaat volledig in die teenwoordigheid van 'n assimileerbare koolstofbron dekarboksileer. Kinetiese studies het aangetoon dat L-malaat deur 'n aktiewe transportsisteen in *S. pombe* opgeneem word. Suksien-, D-appel-, fumaar-, oksaalasyn-, α -ketoglutaar-, maleien- en maloonsuur tree almal as kompeterende inhibitors van L-malaattransport in *S. pombe* op.

Die malaatpermease-geen (*mae1*) van *S. pombe* is deur middel van komplementering van 'n transportmutant met 'n *S. pombe* Sau3A-genoombiblioteek gekloneer. Twee ooplesrame is op die 5,7 kb-DNA-fragment gevind. Die

eerste ooplesraam kodeer vir 'n proteïen (*mae1p*) met 'n afgeleide molekulêre massa van ongeveer 49 kDa. Die wateraffiniteitsprofiel van die afgeleide aminosuurvolgorde toon 'n proteïen met hidrofiliese N- en C-termini, en 10 transmembraan- of geassosieerde domeine, wat tipies van transportproteïene is. Met behulp van gerekenariseerde analises is verskeie gekonserveerde motiewe in die primêre volgorde van die *mae1p* herken. 'n Gekonserveerde PEST-gebied en 'n leusienritssluiters, bestaande uit vier leusienresidu's elk deur ses aminosure gespasieer, is geïdentifiseer. Die proteïen bevat ook verskeie N-glikosileringssetels. Komplementering van die malaatpermeasemutant met die *mae1*-fragment het gelei tot die volle herstel van malaat- en suksinaattransport. 'n Prominente TATAT-sekwensie, wat vier keer herhaal word, is -66 tot -87 bp stroomop van die ATG-kodon gelokaliseer. 'n Direkte 10 bp-herhaling, TCATTTTTTA, wat deur 9 bp geskei word, is -194 tot -203, en -213 tot -222 bp stroomop van die ATG-kodon gevind. Met behulp van die chromokladtegniek is vasgestel dat die *mae1*-geen op chromosoom 1 geleë is. Noordelike kladanalise het aangetoon dat die *mae1*-geen konstitutief uitgedruk word en nie onderworpe aan kataboliet-ondersdrukking is nie, soos wat die geval vir die gene van die malaatsisteen van *Candida utilis* en *Hansenula anomala* is.

* Verhandeling vir die graad M.Sc.; studieleier - prof. H.J.J. van Vuuren