

## ÜBER DEN ENZYMATISCHEN CUTIN-ABBAU

### I. MITTEILUNG: NACHWEIS EINES "CUTINASE"-SYSTEMS

W. HEINEN

(Botan. Laborat. RK Universität, Nijmegen)

(eingegangen am 3. August 1959)

#### EINLEITUNG

Wo pflanzliches Gewebe an die atmosphärische Luft angrenzt, tritt weit verbreitet eine Grenzhaute auf, die den Namen Kutikula trägt (FREY-WYSSLING 1935). Sie ist ein morphologisch wohldefiniertes Gebilde, dessen chemischer Aufbau jedoch uneinheitlich ist. Neben den bekannten hochpolymeren Membranstoffen Cellulose, Pectin und Wachsen ist typisch das Vorkommen von *Cutin*, das dem in der Borke vorkommenden *Suberin* und dem Membranstoff der Pilzsporen und Pollenmembranen *Sporopollenin* verwandt ist. Erst in den letzten Jahren hat man den Versuch gemacht die chemische Konstitution des Cutins aufzuklären (vgl. Übersichtsreferat bei VAN OVERBEEK 1956). Dabei zeigte sich, daß nicht nur die Dicke der Kutikularschicht sondern auch die Zusammensetzung der Kutikularstoffe stark variiert.

Die Kutikula stellt morphologisch und ökologisch eine Schutzrichtung dar. Der Abbau dieser Schutzschicht ist vor allem in Zusammenhang mit zwei biologischen Prozessen von großem Interesse: a. beim Infektionsvorgang durch pathogene Pilze und Bakterien (vgl. GÄUMANN 1951),

b. bei der Inkompatibilitätsreaktion von Cruciferen: nach Selbstbestäubung ist innerhalb dieser Familie die Erscheinung weit verbreitet, daß der Pollenschlauch nicht in der Lage ist, die Kutikula, welche die Narbenpapillen überzieht, zu durchbrechen (TATEBE 1939, LINSKENS 1955, 1959, KROH 1956, CHRIST 1959).

Ohne einer chemischen Konstitution vorzugreifen wird unter dem *Cutin* vorläufig von uns verstanden: ein polymeres Kondensationsprodukt höherer Fettsäuren, das vor allem an der Grenzfläche Pflanzengewebe-atmosphärische Luft vorkommt und wesentlich Schutzfunktionen ausübt.

#### LITERATURÜBERSICHT

##### *Zusammensetzung der Kutikularschicht*

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kutikularschicht ergaben, daß die äußere Begrenzung durch Wachsplättchen gebildet wird, die die Größe von etwa 1–10  $\mu$  haben (MUELLER, CARR und LOOMIS 1954, SCOTT, HAMNER, BAKER und BOWLER 1957). Das Wachs liegt als Film über der eigentlichen Kutikula, die aus einem Gerüst von Cellulose, *Cutin* und eventuell Pectin und *Suberin* besteht (KOLJO 1957). Diese verschiedenen Substanzen können nach den Untersuchungen von MEYER (1938) mehr oder minder ausgebildete Schichten bilden. Die Kutikula reicht entweder direkt in die darunter liegende Celluloseschicht hinein (ROELOFSEN 1952), oder ist häufiger von dieser durch eine Pectinmembran getrennt (ANDERSON

1928, RAWLINS und TAKAHASHI 1952, ROELOFSEN 1952). Bei diesem einfachen Aufbau dient das Cutin der Kutikula nach der Auffassung von FREY-WYSSLING (1953) und HÄRTEL (1950) als Bindeglied zwischen der hydrophilen Cellulose und dem hydrophoben Wachs (vgl. KOLJO 1957). Der Aufbau der Kutikularschicht kann aber dadurch kompliziert werden, daß unter der eigentlichen Kutikula, durch eine Pectinmembran von dieser getrennt, eine breitere, cutinisierte Schicht liegt, auf die erst dann, wiederum durch eine Pectinmembran getrennt, die Cellulose-schicht folgt (SITTE 1955, 1957). Innerhalb dieser cutinisierten Schicht finden sich häufig Wachseinlagerungen (SCOTT und LEWIS 1953, ESAU 1953), manchmal auch freie Fettsäuren (HILKENBÄUMER 1958), jedoch keine Cellulose (SITTE 1957). Durch die enge Bindung des Cutins an die übrigen Zellwandsubstanzen ist die Isolierung des Cutins erst relativ spät versucht, und seine chemische Zusammensetzung nur wenig untersucht worden. Reines Cutin wurde erstmals von LEGG und WHEELER (1925) erhalten und seine Zusammensetzung von LEGG und WHEELER (1929) und LEE (1925) näher untersucht. Nach diesen und anderen (vgl. Übersichtsreferat von MEARA 1955) chemischen Methoden zur Isolierung des Cutins von den übrigen Kutikularsubstanzen hat erst ORGELL (1955) eine biochemische Methode angegeben, die darauf beruht, daß die Pectinmembran zwischen Kutikula und Untergrube mittels pectinspaltender Fermente aufgelöst wird. Den gleichen Erfolg bringt die Methode von SKOSS (1955), die darauf basiert, daß anaerobe Bakterien auf das Untersuchungsmaterial einwirken und alle Stoffe bis auf das Cutin abbauen, das auf diese Weise in reiner Form zurückbleibt.

### *Chemie des Cutins*

Über die Chemie des Cutins war lange Zeit wenig bekannt. Erstmals extrahierte FRÉMY (1859, 1881, 1885) die Kutikula verschiedener Pflanzen mit Lösungsmitteln zur Entfernung der Wachse und behandelte den Rest mit kochendem alkoholischem Alkali. Dabei erhielt er das wasserunlösliche K-Salz des von ihm so benannten festen "Stearocutin" und das wasserlösliche K-Salz des halbflüssigen "Oleocutin". Später fand LEE (1925), daß die Kutikula von Chrysanthemen und Rosen sowohl veresterte, als auch freie Fettsäuren enthält und zur gleichen Zeit fanden LEGG und WHEELER (1925) freie Fettsäuren, Glycoside, verseifbares Material und Cellulose in der Kutikula von Blättern der Agave americana. Näheren Aufschluß über die Konstitution der Cutinfettsäuren brachten schließlich die Arbeiten von MATIC (1956 a, b), aus denen hervorgeht, daß mehr als 60 % des Cutins der Agave americana, in dem keine unverseifbaren Bestandteile gefunden wurden, aus vier verschiedenen Oxyfettsäuren bestehen, nämlich 9, 10, 18-Trihydroxy-octadecansäure, 10, 18-Dihydroxy-hexadecansäure, 10, 18-Hydroxy-octadecansäure und 10, 16-Dihydroxy-hexadecansäure: 80 % dieses Fettsäuregemisches bestehen dabei aus der 10, 18-Dihydroxy-octadecansäure. Interessant ist dabei besonders, daß alle diese Fettsäuren endständige Oxygruppen besitzen. Es erscheint zweifelhaft, ob die in 9- oder 10-Stellung befindlichen Oxygruppen im Cutin tatsächlich enthalten sind, da bei der angewandten Methode eventuell vorliegende Doppelbindungen oxydiert werden können. Es ist nicht sicher, ob die genannten Verbindungen nicht zum Teil auch Artefakte darstellen, was auch von MATIC selbst (private Mitteilung 1959) für nicht ausgeschlossen gehalten wird.

Verestert man Fettsäuren mit derartigen endständigen Oxygruppen miteinander, so erhält man polymere Produkte, die unlöslich, elastisch und temperaturstabil sind, wie es beim Cutin der Fall ist. Cutin ist dem Suberin, das zur Hauptsache aus Phellonsäure ( $C_{22}H_{44}O_3$ ) in Form von Polyestern besteht (DUPONT, DULOU und CHICOISNE 1956), nahe verwandt und ist auch wie dieses hochpolymer und vernetzt (ZETSCHKE 1932, FREY-WYSSLING 1953, TREIBER 1955, 1957).

### *Entstehung des Cutins*

Über die natürliche Synthese des Cutins ist nur wenig bekannt. Man nimmt an, daß die Cutinschicht durch Permeiren flüssiger Vorstufen des Cutins durch die bereits bestehende Cellulosewand und durch Polymerisation dieser Vorstufen an der Oberfläche unter Sauerstoffeinfluß gebildet wird (vgl. FRITZ 1935, PRIESTLEY 1943, LINSKENS 1950, 1952, SITTE 1955). Dafür spricht auch die neuerlich gemachte Beobachtung von BOLLIGER (1959), daß bei der Bildung der Kutikula von *Philodendron* elektronenmikroskopisch kleinste Fetttropfen nachweisbar sind, die von

innen her in Richtung der Oberfläche wandern. Bezüglich des möglichen Einflusses des Sauerstoffs auf die Cutinbildung sind die Ergebnisse von SIDDIQI und TAPPEL (1956) von Bedeutung: sie ließen ein Gemisch aus Leinöl und einer aus Erbsen gewonnenen Lipoxydase 7 Tage lang an der Luft stehen und erhielten dabei einen unlöslichen Film, der nicht nur äußerlich dem Cutin ähnelte, sondern auch die gleiche UV-Fluoreszenz hatte wie dieses. Zieht man diese mögliche Beteiligung der Lipoxydase an der Cutinbildung in Betracht, so kann man sich vorstellen, daß die Fettsäuren (Linol- und Linolensäure) zunächst innerhalb der Zelle zu Monohydroperoxyden oxydiert werden, die dann an die Oberfläche wandern, um dort (möglicherweise unter weiterer Sauerstoffaufnahme) zu Cutin zu polymerisieren.

Die Auffassung wird gestützt durch die Tatsache, daß sowohl autoxydativ (PRIVETT und NICKELL 1956, CHIPAULT 1952, SLOVER und DUGAN 1958) als auch enzymatisch (BERGSTROM 1945, FRANKE, MÖNCH, KIBAT und HAMM 1948, FRANKE und FREHSE 1953) anoxydierte Linolsäure starke Neigung zur Polymerisation zeigt. Nach den bisherigen Kenntnissen (vgl. KAUFMANN 1958) verläuft die Polymerisation über die Bildung konjugierter Hydroperoxyde, wobei in Abhängigkeit von der Temperatur entweder cis-trans- oder trans-trans-konjugierte Hydroperoxyde entstehen können (KHAN 1953, 1955, KHAN, LUNDBERG und HOLMAN 1954, PRIVETT, NICKELL, TOLBERG, PASCHKE, WHEELER und LUNDBERG 1954). Wenn die Ergebnisse von MATIC (1956) dafür sprechen, daß das Cutin aus veresterten Polyoxylfettsäuren aufgebaut ist, so könnte nach den letztgenannten Autoren auch eine Vernetzung über Sauerstoffbrücken (Peroxydbrücken?) als Aufbauprinzip des Cutins angenommen werden (vgl. KAUFMANN 1958). Zu bedenken ist dabei jedoch, daß die zur Bildung der Primärperoxyde notwendige Lipoxydase keineswegs in allen Pflanzen vorkommt (SÜLLMANN 1943, HOLMAN 1948, FRANKE 1951), FRANKE und FREHSE 1957). Schließlich ist noch denkbar, daß beide Bindungsprinzipien — Esterbindung und Sauerstoffbrücken — nebeneinander bestehen. So unsicher der Verlauf der Cutinbildung aufgrund der geringen Kenntnisse über die chemische Konstitution des Cutins auch heute noch ist, so kann doch als experimentell erwiesen nicht nur die Ausbildung der Cutinschicht bei der Neubildung von Blättern und Früchten (HÄRTEL 1950, HUELIN und GALLOP 1951, DAVENPORT 1956, FREYTAG 1957) und deren Beeinflussung durch äußere Faktoren, wie z.B. Chemikalien (JUNIPER und BRADLEY 1958, JUNIPER 1959), sondern auch die Fähigkeit zur Neubildung verletzter oder zerstörter Teile der Schicht und zwar durch Regeneration von unten her (FRITZ 1935, GRETSCHUSCHNIKOW und JAKOWLEWA 1951, SUCHORUKOW 1958) angesehen werden.

### *Abbau des Cutins*

Über einen möglichen enzymatischen Abbau des Cutins liegen bisher keine experimentellen Befunde vor, obwohl eine große Anzahl phytopathologischer Arbeiten (vgl. GÄUMANN 1951) in diese Richtung weisen. Das beobachtete Eindringen phytopathogener Keime in Blätter oder Früchte wurde in enzymatischer Hinsicht bisher im Hinblick auf die Aktivität cellulolytischer und pectolytischer Enzyme (vgl. Übersichtsreferat von KERTESZ 1951) untersucht, die sich auch in einer großen Anzahl von Pilzen, insbesondere in *Aspergillus*-, *Penicillium*-, *Cladosporium*- und *Pullularia*-Arten, sowie auch in vielen Bakterien nachweisen ließen (WIERINGA 1955, SCHAEFER 1957, ALEXEJEW 1956, WOOD 1956, SINGH und WOOD 1956, WOOD und GUPTA 1958, HUSAIN und RICH 1958, HUSAIN und KELMAN 1958, KOHLMAYER 1956, 1958, ECHAUDI, van GUNDY und WALKER 1957, SKOSS 1955, GOTO und OKABE 1958). Die Frage, wie der Erreger die Cutinmembran durchdringt, wird entweder nicht diskutiert, oder aber es wird angenommen, daß zwar Cellulose und Pectin enzymatisch aufgelöst werden, das Cutin jedoch aufgrund der Befunde älterer Arbeiten (MYOSHI 1895) mechanisch durchbohrt wird (GÄUMANN 1951, SCHWEIZER 1958), wozu jedoch Drücke von etwa 7 Atm. notwendig wären. Immerhin weisen einige Beobachtungen auf enzymatische Vorgänge während der Infektion hin. So beobachteten YARWOOD (1957), PRISTOU und GALLEGLY (1954) und PURDY (1958) die Bildung einer deutlichen Einbuchtung unterhalb des Appressoriums, die durch Auflösung der Cutinschicht entstanden sein kann, da es sich nicht um ein Durchbiegen der gesamten Kutikularschicht handelt. SCHWEIZER (1958) stellte eine Schleimbildung am Appressorium fest und kreisförmige Perforationsstellen nach dem Eindringen des Erregers. Während FULTON (1948) ein An-

schwellen der Infektionshyphe innerhalb der Cutinschicht beschrieb, sprach MILLER (1949) erstmals die Vermutung aus, daß bei der Infektion von Olivenblättern, deren Kutikula zwei Cutinlagen untereinander enthält, der zwischen beiden Lagen wachsende Pilz (*Cycloconium oleaginum*) über cutin-spaltende Enzyme verfügen muß. Die Annahme einer enzymatischen Cutinspaltung wird weiterhin dadurch gestützt, daß auch Organismen, die keine Appressorienbildung zeigen, zur Durchdringung der Kutikula mit anschließender Infektion der Wirtspflanze befähigt sind, wie es neuerdings von KILPATRICK (1959) bei einer Hefe (*Rhodotorula glutinis*) mit verschiedenen Kleesorten, Bohnen und Erbsen als Wirt, beschrieben worden ist.

Außer in Bezug auf phytopathologische Fragen ist das Problem der Kutikuladurchdringung auch in Hinsicht auf die eingangs erwähnte Selbststerilität bestimmter Pflanzen von Bedeutung (LINSKENS 1955, 1959, CHRIST 1959). Zwar konnten in den Pollen bzw. Pollenschläuchen bisher keine cutin-lösenden Enzyme nachgewiesen werden (CHRIST 1959), doch wurden an den Stellen wo der Pollenschlauch in den Stempel eingedrungen war, kreisrunde Löcher mit glattem Rand festgestellt, was für eine enzymatische Auflösung spricht, da beim Eindringen durch Druck Öffnungen mit ausgefranzten Rändern zu erwarten wären (CHRIST 1959).

Neuere Arbeiten (FORSYTH, HAYWARD und ROBERTS 1958, HAYWARD, FORSYTH und ROBERTS 1959) über eine in Form kleiner Granula (LEMOIGNE, DELAPORTE und CROSON 1944, CARR 1958) in verschiedenen Bakterien vorkommenden wachsähnliche Substanz, die wahrscheinlich als Reservestoff dient (MACRAE und WILKINSON 1958) und dem Cutin rein chemisch recht nahe verwandt ist, da sie nach WILLIAMSON und WILKINSON (1958) hauptsächlich aus Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure besteht, zeigten, daß Synthese und Abbau der Verbindung von den Kulturbedingungen abhängig ist, da in Abhängigkeit hiervon unterschiedliche Mengen in den Bakterien gebildet wurden. Daraus ergibt sich, daß die enzymatische Bildung und Auflösung derartiger Fettsäurepolymerer grundsätzlich im physiologischen Bereich möglich sind.

Schließlich ergibt auch die völlige Destruktion des Ausgangsmaterials bei der Bildung des Waldstreus (WIERINGA 1955), der Moderfäule des Holzes (KOHLMAYER 1958), der Verrottung von Gartenabfällen bei der Kompostierung (STÖCKLI 1954, GERRETSEN 1957, FARKASDI 1958, HEINEN 1960), der Mull- und Humusbildung (MEYER 1959) und der Naßfäule der Pflanzen (ECHAUDI, van GUNDY und WALKER 1957) einen deutlichen Hinweis auf die Existenz derartiger Enzyme, die zum Abbau hochpolymerer Fettsäureverbindungen wie Cutin befähigt sind.

## FRAGESTELLUNG

Daß das Problem des enzymatischen Cutin-Abbaus bisher nicht bearbeitet worden ist, ist wohl zur Hauptsache auf die damit verbundenen methodischen Schwierigkeiten zurückzuführen: Cutin ist sowohl in Wasser als auch in den üblichen organischen Solventien unlöslich, und läßt sich nur durch Hydrolyse in alkoholischem Alkali auflösen, wobei aus dem Polymerisat die freien Fettsäuren (bzw. ihre Seifen) entstehen, so daß damit die Untersuchung der Primärreaktion, eben der enzymatischen Hydrolyse, ausgeschlossen ist. Enzymatische Untersuchungen an unlöslichen Substraten wurden bisher nicht sehr häufig durchgeführt. Immerhin ist die Kultivierung cellulosespaltender Pilze auf Cellulosenährböden in Form von Filtrierpapier, Watte, oder amorphen Fällungen verschiedentlich ausgeführt worden (FAHRAEUS 1947, REESE, GILLIGAN und NORKRANS 1952, SIU und REESE 1953, SIU 1954, KOHLMAYER 1956, SCHAEFER 1957). Die Reaktion wurde dabei durch Gewichtsabnahme des unlöslichen Substrates oder durch den Nachweis der Spaltprodukte verfolgt. Ähnliche Methoden wurde auch bei der Verfolgung des komplizierteren Ligninabbaus (BIRKINSHAW und CHAPLEN 1955, BIRKINSHAW, CHAPLEN und FINDLAY 1957, COOKE 1957) angewendet.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, den enzymatischen Abbau des Cutins direkt und indirekt nachzuweisen, um somit Aufschluß über den Ablauf der Reaktionen zu erhalten.

## METHODIK

### 1. Pilzmaterial und Züchtung

Zu den geplanten Untersuchungen kamen in erster Linie solche Organismen in Frage, bei denen die Existenz cellulolytischer oder pectolytischer Enzyme als gegeben angenommen werden konnte, also phytopathogene oder holzzerstörende Pilze. Drei der hier verwendeten Stämme stammten aus der Institutsammlung, nämlich *Fusicladium cerasi* (Rabh.) Sacc. (= *Venturia cerasi* AD.), der Erreger des Kirschen- und Pfirsichschorfs (SCHWEIZER 1958), *Fusarium moniliforme*, der als Holzzerstörer bekannt ist (KOHLMAYER 1956) und *Rhodotorula glutinis* Var. *rubescens*, eine Hefe welche nach KILPATRICK (1959) bei Klee, Bohnen und Erbsen chlorotische Verfärbung der Blätter und Beschädigungen der Samen hervorruft. Weitau die meisten Versuche wurden jedoch mit einem *Penicillium spec.* durchgeführt, das von einem verrottenden Blatt isoliert wurde. Die Stammkulturen wurden auf Malz- oder Hafer-flocken-Agar gehalten.

Zum direkten Nachweis des Cutinabbaus wurden die Pilze auf Malzextrakt oder Czapek-Dox-Lösung in kleinen Petrischalen angezüchtet bis sich ein feines Mycel gebildet hatte. Sodann wurde diese Nährlösung vorsichtig abgegossen und nach mehrmaligem Unterspülen mit Wasser eine Nährlösung, bestehend aus 0,5 % Ammonsulfat, 0,5 % prim. K-Phosphat, 0,1 % Calciumnitrat, 0,1 % Magnesiumsulfat und einer Spur Eisenchlorid, zugesetzt. Als einzige C-Quelle wurden 0,25 % Cutin zugegeben. In verschiedenen Fällen wurde das Cutin in Form kleiner Scheibchen von ca. 1,5 cm<sup>2</sup> Größe zugesetzt. Auf diesen Lösungen entwickelten sich die Pilze nur wenig weiter und sporolierten sehr rasch.

Da zu den enzymatischen Versuchen größere Mycelmengen notwendig waren, wurden die Pilze dazu nicht auf cutin-, sondern kohlenhydrathaltigen Nährlösungen angezüchtet. Als Nährlösung diente dabei bei *Penicillium spec.* Czapek-Dox-Lösung, bei *Fusarium moniliforme* eine Nährlösung nach GAERTNER (1958) mit Kartoffeldekot als C-Quelle, bei *Fusicladium cerasi* Malzextrakt; *Rhodotorula glutinis* wurde auf Malz-Agar in Kolleschalen gezüchtet. Die Petrischalen bzw. Kolleschalen wurden jeweils 3–4 Tage bei 28° gehalten.

### 2. Präparate

Von den verwendeten Substraten stammten Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure aus Institutsbeständen, Öl-, Linol- und Linolensäure von SCHUCHARDT (München). Die substituierten Fettsäuren  $\alpha$ -Oxystearinsäure, 12-Oxystearinsäure und 9, 10-Dioxystearinsäure waren Präparate aus der enzymchemischen Abteilung des Instituts für Gärungswissenschaft und Enzymchemie der Universität Köln, die uns von Herrn Professor Dr. W. FRANKE freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Freie Cutin-Fettsäuren (Cutin-Hydrolysat) wurden nach ROELOFSEN (1952) und MATIC (1956) durch mehrstündiges Kochen des fein gemahlten Cutins mit alkoholischem Alkali am Rückfluß gewonnen. Als Pflanzenmaterial zur Gewinnung von Cutin diente *Gasteria verrucosa*, die sich durch eine besonders dicke Kutikula auszeichnet. Die Trennung der Cutinschicht von den darunterliegenden Pectin- und Celluloseschichten geschah nach der Methode von ORGELL (1955) durch mehrstündiges Schütteln von ca. 1,0–1,5 cm<sup>2</sup> großen Blattscheibchen in einer 3 %igen Pectinaselösung in 0,1 n Acetatpuffer von pH 4,0. Bei den glatten Stückchen aus dem Mittelteil der Blätter erfolgte die Ablösung der Cutinschicht bereits nach 12 Stdn.; nach 36 Stdn. war die Trennung bei allen Stückchen vollständig. Die weitere Behandlung erfolgte nach der Methode von LEGG und WHEELER (1925) durch 4–5-maliges 24-stündiges Extrahieren mit absol. Alkohol am Rückflußkühler zur Entfernung der Wachse und eventuell vorhandener freier Fettsäuren. Die Entfernung der Cellulose geschah durch 5–6-malige Behandlung des Materials mit Kupferammoniak, wobei zu bemerken ist, daß die Ablösung der Cutinschicht

durch die Pectinase so sauber vor sich geht, daß nur in den Blattecken, in denen offenbar eine direkte Verbindung der Celluloseschicht mit der Cutinschicht ohne Pectinzwischenlage punktweise gegeben ist, noch geringe Reste von Cellulose vorhanden sind. Der Fortgang der Cutinisolierung wurde außer mit den üblichen Färbungsmethoden durch Röntgenaufnahmen von den einzelnen Schritten verfolgt. In Abb. 1 zeigt Bild 1 das Aussehen des Materials nach der Behandlung der Blatt-

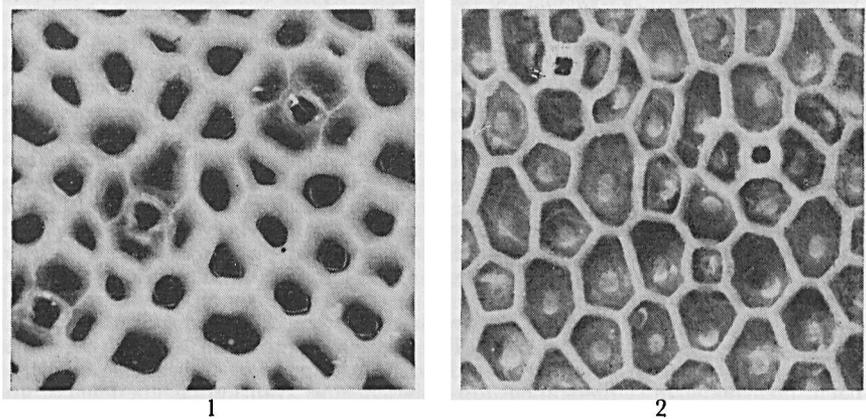


Abb. 1. Röntgenmikroskopische Verfolgung der Vorgänge bei der Cutin-Isolierung von Blättern von *Gasteria verrucosa*.

1 = nach Behandlung der Blattstückchen mit Pectinaselösung  
2 = nach Entfernung der Wachsschicht durch Extraktion in absol. Alkohol.

scheibchen mit der Pectinaselösung; in Bild 2 ist das gleiche Stück nach Entfernung der Wachsschicht durch die Alkoholbehandlung wiedergegeben: das Verschwinden des Wachsbelages ist deutlich zu erkennen. Aufnahmen nach der Kupferammoniakbehandlung zeigten, daß keine weiteren Veränderungen mehr festzustellen sind.

Die getrockneten Scheibchen wurden sodann in einer Schlagmühle zu feinem Pulver gemahlen und anschließend die Behandlung mit absol. Alkohol nochmals 12 Stdn. wiederholt, um eventuell freigesetzte Fettsäuren aus dem Innern der Cutinschicht (HILKENBÄUMER 1958) zu entfernen. Zum Schluß wird das Cutin mehrmals mit HCl und heißem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Man erhält ein braunes, elastisches Material das trocken aufbewahrt wird.

### 3. Herstellung der Enzymlösungen

Das in einer Öldruckpresse trocken gepreßte, zuvor mehrfach gewässerte Pilzmycel wurde mit der gleichen Menge Seesand und der 1,5–2,0-fachen Menge Wasser oder m/5 Phosphatpuffer von pH 7,6 verrieben, sodann etwa 30 Min. zur Extraktion stehen gelassen (im Kühlschrank bei + 5°) und anschließend 12 Min. bei 2000 g zentrifugiert. In vielen Fällen wurde das Mycel zunächst wie angegeben mit Wasser extrahiert und nach dem Zentrifugieren der Rückstand nochmals mit Phosphatpuffer extrahiert. Die so erhaltenen meist schwach getrübbten Extrakte wurden in Eiswasser aufbewahrt. Trockengewichtsbestimmungen erfolgten bei 110° nach 48-stündiger Dialyse gegen fließendes Leitungswasser.

In verschiedenen Fällen wurden die Enzymlösungen vor ihrer Verwendung im Cellophanschlauch (2,2 cm ø) 2–4 Stdn. gegen dest. Wasser bei + 5° dialysiert.

### 4. Reaktionsmessungen

a. Zur direkten Verfolgung der cutinabbauenden Wirkung von Pilzen wurde das normal angezüchtete Mycel mit der oben (Abschn. 1) angegebenen Nährlösung unterschichtet und mehrere Cutinstückchen als C-Quelle zugesetzt. Nach verschieden langer Einwirkungszeit des Pilzes auf die Scheibchen wurden diese aus der Lösung entnommen, der darauf haftende Pilz vorsichtig abgehoben und sodann

in Wasser gespült. Nach dem Trocknen wurden die Stückchen mikroskopisch untersucht und z.T. röntgenmikroskopische Aufnahmen gemacht, oder von der Oberfläche Abdrücke mit Technovit hergestellt (SCHREIL 1955) und davon Aufnahmen gemacht.

b. Die Dehydrase-Wirkung wurde nach der Thunberg-Methodik bei 30° mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol als H-Acceptor untersucht. Der "Normalansatz" hatte folgende Zusammensetzung:

0,8 ml Enzymlösung	0,9 ml H <sub>2</sub> O
1,0 „ m/10 Phosphatpuffer pH 6,0	3,0 mg Cutin
0,3 „ m/500 Farbstofflösung	

Veränderungen dieses Ansatzes sind im Text jeweils vermerkt. Neben den Entfärbungszeiten (in Minuten) des vollständigen Ansatzes ( $t$ ) und des substratfreien ( $t_0$ ) wird im folgenden die Dehydrierungsintensität

$$I = 100(1/t - 1/t_0)$$

und die spezifische Dehydrierungsintensität

$$I_0 = I/mg \text{ Enzymtrockengewicht}$$

angegeben. Bisweilen wird unter der Rubrik "% I<sub>0</sub>" die prozentische Aktivität, bezogen auf I<sub>0</sub> des Ausgangsextraktes, angegeben. Die Bestimmung des Endpunktes der Entfärbungsreaktion geschah entweder optisch, oder aber Reaktionsgeschwindigkeit und -Endpunkt wurden photometrisch bestimmt.

c. Die Aktivitätsprüfungen nach der Warburg-Methodik erfolgten bei 30° unter Luft mit dem "Normalansatz" gleicher Zusammensetzung wie bei den anaeroben Versuchen. Als Maß der Aktivität diente die aus der Anfangsgeschwindigkeit (10 Min.) errechnete Atmungsgröße

$$Q_{O_2} = \frac{m^3 m O_2}{mg \text{ Enzymtrockengew.} \times \text{Stdn.}}$$

Veränderungen des Ansatzes in Bezug auf die Enzym- oder Substratkonzentration oder Variation des pH-Wertes sind jeweils im Text angegeben.

## VERSUCHSERGEBNISSE

### A. ORIENTIERENDE VERSUCHE

Die einleitenden Versuche hatten den Zweck, festzustellen, ob bei dem von rottenden Blättern isolierten *Penicillium spec.* eine Aktivität gegenüber Cutin überhaupt vorhanden war. Dazu wurde dem normal angezüchteten Pilz eine anorganische Nährlösung mit fein gemahlenem Cutin als einziger C-Quelle als Nährsubstrat angeboten und das weitere Wachstum verfolgt. Es zeigte sich dann (Fig. 1), daß sich das Mycel nur sehr schwach weiterentwickelte und früher als normal sporolierte.

Um mögliche Veränderungen am Cutin während der Verwendung als Substrat beobachten zu können, wurde es in der folgenden Versuchsreihe nicht in gemahlenem Zustand, sondern in Form kleiner Scheibchen von etwa 1,5 cm<sup>2</sup> Größe zugesetzt. In diesem Fall war zu beobachten, daß sich das Mycel an die Stückchen lose anheftet und darauf — wenn auch recht schwach, wie beim vorherigen Versuch und unter frühzeitiger Sporulation — weiterwuchs. Anhand von Röntgenaufnahmen und noch besser an den davon erhaltenen Umkehrfotos ließ sich die Veränderung des Materials während der Einwirkung der Pilzenzyme gut verfolgen. In Abb. II sind die Abbau-

stadien, mit der Einwirkungszeit 0 Tage = Kontrolle (1), 14 Tage (2), 21 Tage (3) und 28 Tage (4) wiedergegeben. Die Verdickungen der Cutinschicht, die zuvor die Epidermiszellen begrenzten, wie es aus dem Querschnitt der Abb. III, 1 zu ersehen ist und die hier als "Zell-

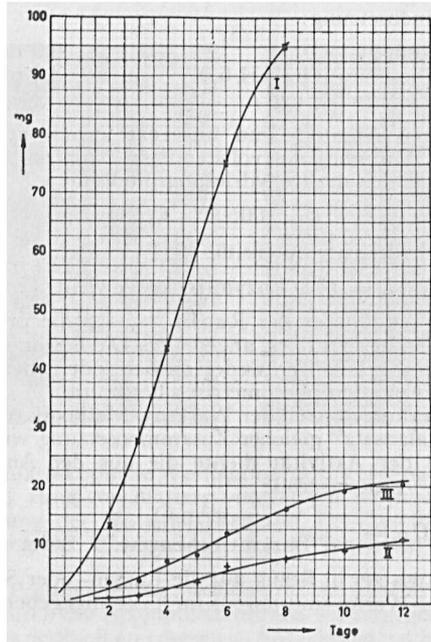


Fig. 1. Wachstumskurven von *Penicillium* sp. auf vollsynthetischer Nährlösung mit Glucose (I), reinem Cutin (II) und unvollständig gereinigtem Cutin, mit Spuren von Wachs und Celluloseresten (III) als jeweils einziger C-Quelle.

wände" erscheinen, machen zunächst einen starren und festen Eindruck. Nach zweiwöchiger Einwirkung der Pilzenzyme erscheinen sie dagegen aufgequollen und außerdem sind dünnere, "angenagte" Stellen zu erkennen. Nach drei Wochen ist besonders in den Eckpunkten eine Auflösung zu sehen und Bruchstellen in den "Wänden" sind festzustellen (s. Pfeile!). Nach vier Wochen macht sich eine deutliche Abnahme der Wanddicke bemerkbar und auch die Wandhöhe hat abgenommen, was daraus zu ersehen ist, daß hier — stärker noch als bei Bild 3 — die eigentliche "Fläche" der Cutinschicht in der gleichen Ebene erkennbar wird, während in den beiden vorausgehenden Fotos nur die "Wände" allein zu sehen sind.

Die Dickenabnahme ist auch auf den Querschnitten der Abb. III zu erkennen: Die klar begrenzten Flächen und Zähne ("Wände") der Kontrolle (1) sind nach 6-wöchiger Einwirkung des Pilzes (2) dünn und weich geworden. Diese Veränderung des Materials ist auch äußerlich erkennbar: die zunächst spröden Scheibchen werden im Laufe des fortschreitenden Angriffs weich, unelastisch und auf den Oberflächen schleimig.

Zur Verfolgung der Strukturänderungen der Oberflächen wurden

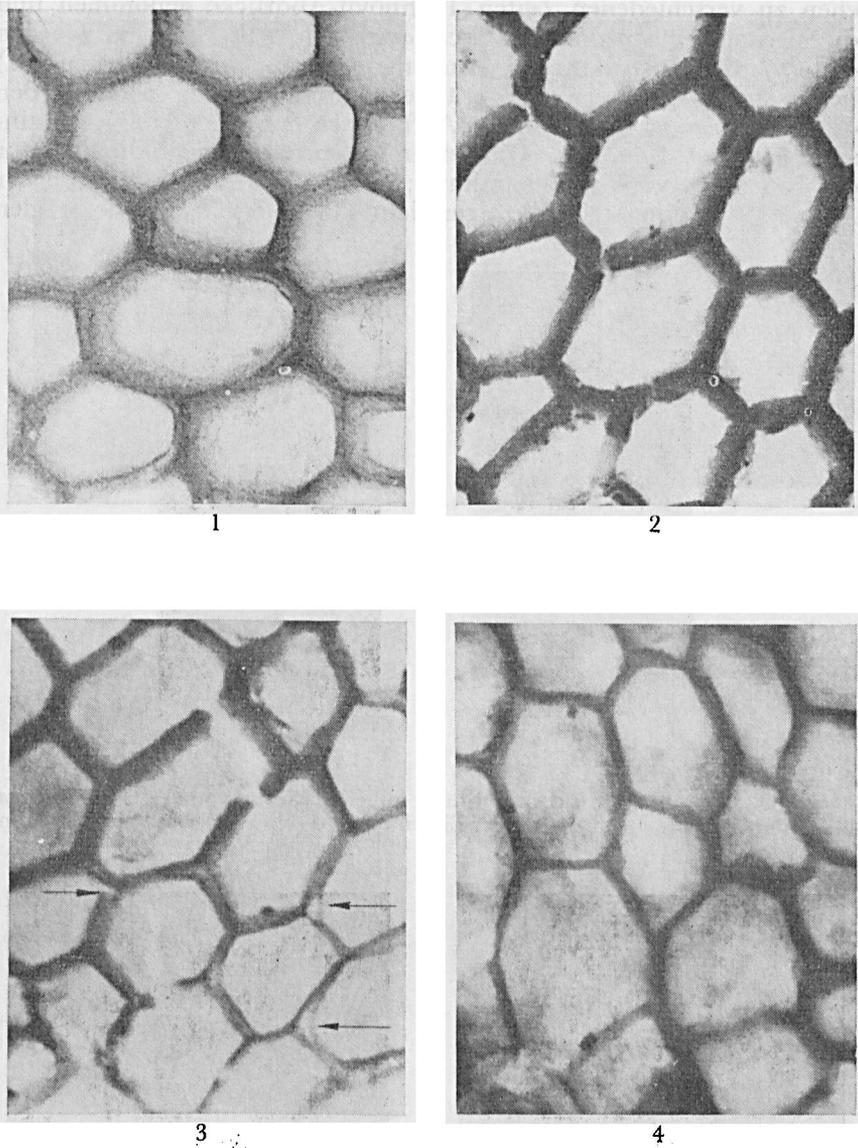


Abb. II. Veränderungen des Cutins unter Einwirkung der Enzyme von *Penicillium spec.* (Umkehrfotos von Röntgenaufnahmen) 1 = Kontrolle (Einwirkungszeit 0 Tage); 2 = Einwirkungszeit 14 Tage; 3 = Einwirkungszeit 21 Tage; 4 = Einwirkungszeit 28 Tage.

sowohl von der Außen- als auch von der Innenseite der Cutinscheibchen zu verschiedenen Zeiten Technovit-Abdrücke genommen und die Veränderungen mikroskopisch festgestellt. Abb. iv zeigt, wie sich die Oberflächenstruktur der Außenseite eines Cutinstückchens (1) bereits nach 14 Tagen (2) verändert hat. Deutlicher noch werden die Strukturänderungen auf den Aufnahmen der Innenseite der Cutinscheibchen (Abb. v, 1-4). Die beiden ersten Fotos zeigen die Struktur der Innenseite vor der Behandlung; in Bild 1 ist auf die Spitzen der Zähne scharf eingestellt, die eigentliche Fläche erscheint (wie bei den

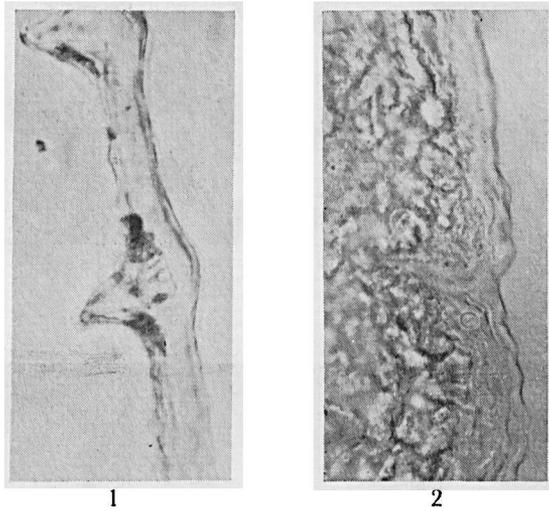


Abb. III. Querschnitt durch ein Stück isoliertes Cutin von *Gasteria verrucosa*, 1 = Kontrolle; 2 = nach 6-wöchiger Einwirkung von *Penicillium spec.* auf das Cutin.

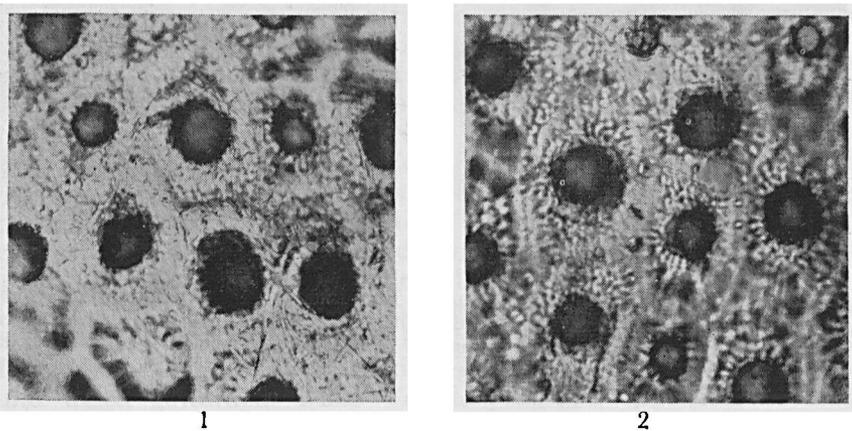
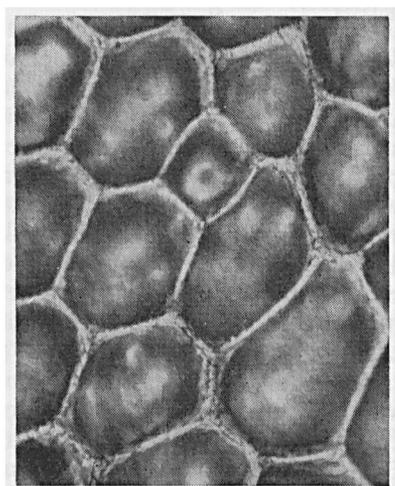
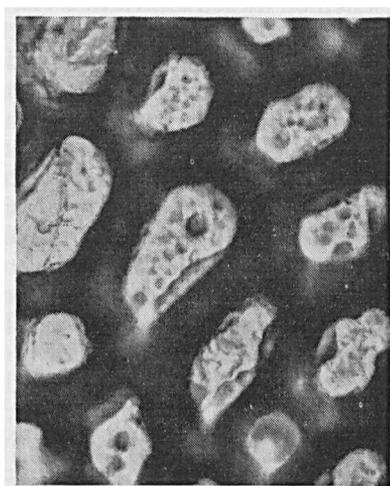


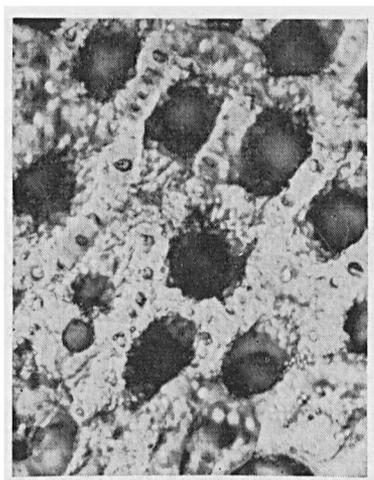
Abb. IV. Oberflächenstruktur der Außenseite eines Cutinscheibchens von *Gasteria verrucosa* (Technovit-Abdruck). 1 = Kontrolle; 2 = Veränderung der Oberfläche nach 14-tägiger Einwirkung von *Penicillium spec.*



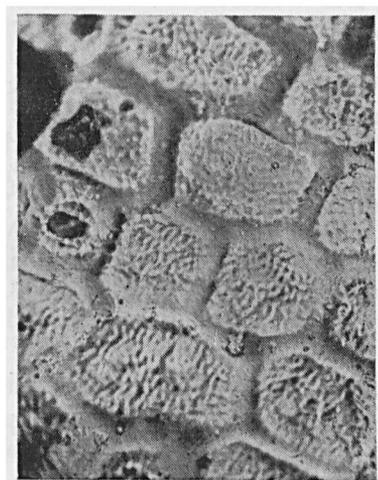
1



2



3



4

Abb. v. Veränderungen der Oberflächenstruktur der Innenseite eines Cutinscheibchens von *Gasteria verrucosa* durch Einwirkung der Enzyme aus *Penicillium spec.* 1 = unbehandeltes Stück (Kontrolle), auf die Spitzen der Zähne scharf gestellt; 2 = das gleiche Stück, auf die Flächen scharf gestellt (vgl. Text!). 3 = Struktur nach 3-wöchiger Einwirkung des Pilzes; 4 = nach 5-wöchiger Einwirkung.

Röntgenfotos) als Hohlraum. Auf grund der größeren Höhe der Zähne erscheinen diese Hohlräume von der Unterseite aus gesehen bedeutend größer als von der Außenseite her, was beim Vergleich mit der Abb. iv gut zu erkennen ist. Im folgenden Foto (2) ist auf die Fläche scharf gestellt, wodurch nun die Zähne ("Wände") breit und unscharf erscheinen. Bild 3 zeigt die Struktur nach dreiwöchiger Einwirkung des Pilzes. Hier ist wiederum auf die höchste Stelle der Zähne, deren Spitzen bereits verschwunden sind, und die deshalb breiter erscheinen, eingestellt; die "Hohlräume" sind wegen des geringeren Abstandes bereits viel kleiner. Nach fünfwöchiger Einwirkung (4) ist die Destruktion bereits so weit fortgeschritten, daß Zähne und Flächen in einer Ebene erscheinen; an einigen Eckpunkten sind beginnende, und oben rechts eine bereits vollständige Bruchstelle (wie auf den Röntgenaufnahmen der Abb. II, 3 und 4) zu erkennen.

Es scheint von Interesse, daß die vorstehenden Teile der Scheibchen, die Zähne, im Laufe der Destruktion offenbar eher angegriffen werden als die Fläche selbst und dies obwohl die Stückchen während der Einwirkungszeit stets mit der Außenseite nach oben in der Nährlösung lagen, so daß der darauf wachsende Pilz mit der Innenseite keinen direkten Kontakt hatte.

## B. ENZYMATISCHE VERSUCHE

Die weiteren Versuche liefen darauf hinaus, den stattfindenden Abbau mit enzymatischen Methoden zu verfolgen (vgl. HEINEN und LINSKENS 1960). Ausgehend von der Überlegung, daß beim Cutinabbau nach der Aufspaltung des Polymerisates freie Fettsäuren erscheinen müssen, die (wie die orientierenden Versuche zeigten) vom Pilz als C-Quelle benutzt werden können, war in irgend einer Phase des weiteren Abbaus eine Dehydrierung dieser Fettsäuren zu erwarten, zumal Fettsäuredehydrasen in Schimmelpilzen schon verschiedentlich nachgewiesen worden sind (MUKHERJEE 1951, 1952, FRANKE und HEINEN 1958). Da eine derartige Dehydrierung eine vorhergehende enzymatische Spaltung des Cutins voraussetzt, wäre damit eine indirekte Verfolgung der Spaltungsreaktion möglich.

### I. Nachweis einer Dehydrase

Zunächst was also festzustellen, ob die aus dem Cutin durch Behandlung mit alkoholischem Alkali entstehenden Fettsäuren für den Pilz angreifbar waren. Dazu wurde das Hydrolysat in Thunberg-Ansätzen als Substrat einer *Mycelsuspension* von *Penicillium spec.* verwendet. In ersten Versuchen zeigte sich, daß eine Dehydrierung des Hydrolysytes nachweisbar ist; zum Vergleich lief ein Ansatz mit Cutin als Substrat mit und ergab, daß dieses nur in sehr geringem Maße dehydriert wird:

Leer-Ansatz:	$t_0 = 18$ Min.	<i>I</i> -Wert
8 mg Hydrolysat:	$t_H = 12$ „	2,77
8 mg Cutin:	$t_C = 16$ „	0,69

Aus der Beobachtung, daß auch das Cutin (wenn auch in geringem Maße) durch die Mycelsuspension dehydriert wird ist zu schliessen, daß entweder freie Fettsäuren darin vorhanden sind (HILKENBÄUMER 1958), oder daß die Suspension neben der Dehydrase ein Enzym enthält, daß aus dem Cutin Fettsäuren freisetzt, worauf später eingegangen wird.

Nachdem Vorversuche ergeben hatten, daß das Enzym relativ leicht aus dem Mycel zu extrahieren ist, ergaben *Extraktionsversuche* bei verschiedenen pH-Werten (Extraktion bei pH 5.2, 5.6, 6.0, 6.8 und 7.2) einen recht weiten optimalen Extraktionsbereich von pH 5,5–6,8, so daß statt des Puffers ebenso gut Wasser zur Extraktion benutzt werden konnte. Bei der Bestimmung der pH-Aktivität der Dehydrase ergab sich ein ausgeprägtes Optimum bei pH 6,2. Die Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration ergab einen relativ engen Bereich von

TABELLE I

Abnahme der Dehydrase-Aktivität gegenüber Cutinhydrolysat-Fettsäuren durch Alterung bei 5 und 24°) und Dialyse bei + 5°.

Enzymlösung	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$	% $I_0$
frisch	34	12	5,38	0,82	100
4 Stdn. bei 24°	38	17	3,25	0,49	60
4 „ „ 5°	35	14	4,28	0,63	70
4 „ Dialyse	∞	160	0,62	0,09	11,5

2,1–8,3 mg Enzymtrockengewicht pro Ansatz. Gegenüber Alterung und Dialyse zeigte sich die Dehydrase sehr empfindlich. Aus Tab. 1 ist zu ersehen, daß die Aktivität schon bei der Alterung rapide abnimmt und bei der Dialyse nach 4 Stdn. nur noch 11,5 % der Ausgangsaktivität erhalten sind. Die Ergebnisse dieser Versuche weisen darauf hin, daß die hier vorliegende Dehydrase mit der von FRANKE und HEINEN (1958) in *Aspergillus niger* und *Rhizopus tonkinensis* nachgewiesenen Fettsäure-Dehydrase wenn nicht identisch so doch zumindest nahe verwandt ist.

## II. Indirekter Nachweis eines cutinspaltenden Enzyms

### 1. Nachweis mittels der Thunberg-Methodik

Bei den Versuchen zur Extraktion der Dehydrase mit Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten lief neben dem Leer- und Substrat-(=Hydrolysat-)Ansatz auch stets ein Ansatz mit Cutin als Substrat mit, da sich ja in der Mycelsuspension eine geringe Aktivität auch gegenüber dem nichthydrolysierten Cutin gezeigt hatte. Dabei ergab sich neben dem bereits genannten Aktivitätsunterschied der Dehydrase in Abhängigkeit vom Extraktions-pH-Wert auch ein Unterschied der Aktivität gegenüber dem Cutin. Wie Tab. 2 zeigt, steigt die Aktivität gegenüber dem Cutin mit steigendem pH-Wert an, wobei ein Optimum hier nicht erreicht wird. Daraus ergibt sich, daß die Aktivität der Dehydrase gegenüber Cutin, die bereits in der Mycelsuspension in geringem Maße festzustellen war, nicht auf eventuell vorhandene freie

Fettsäuren im Cutin zurückzuführen ist, sondern daß ein Enzym vorhanden sein muß, welches das Cutin aufspaltet und die Reaktionsprodukte der Dehydrase zugänglich macht.

Nachdem zuvor festgestellt worden war, daß bei Extraktion der Dehydrase mit Wasser niemals eine Aktivität gegenüber dem Cutin auftrat, wurde nun nach der wässrigen Extraktion eine solche mit

TABELLE II

Aktivität dreier bei verschiedenem Extraktions-pH gewonnener Extrakte aus *Penicillium spec.* gegenüber Cutinhydrolysat-Fettsäuren und Cutin.

Extraktions-pH	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$
5,8	Hydrolysat	38	13	5,13	1,02
	Cutin		20	2,37	0,48
6,5	Hydrolysat	42	15	4,28	0,85
	Cutin		17	3,50	0,69
7,3	Hydrolysat	45	35	0,66	0,13
	Cutin		16	4,03	0,80

Phosphatpuffer vom pH 6,7 durchgeführt. (Der pH-Wert wurde deshalb im genannten Bereich gewählt, weil hier Aktivität gegenüber beiden Substraten zu erwarten war, wie das Beispiel der vorhergehenden Tab. 2 zeigt.) Dabei geht die Dehydrase fast vollständig im Wasserextrakt ( $E_1$ ) in Lösung; Aktivität gegenüber Cutin ist darin nicht vorhanden. Der Pufferextrakt ( $E_2$ ) zeigt nur sehr geringe Aktivität gegen beide Substrate. Gibt man jedoch beide Extrakte zusammen, so zeigt sich deutlich, daß nun beide Substrate angegriffen werden, woraus sich ergibt, daß das Enzym, welches das Cutin anzugreifen vermag, durch Extraktion mit Puffer in Lösung zu bringen ist (Tab. 3).

TABELLE III

Dehydrierung von Cutinhydrolysat-Fettsäuren und unbehandeltem Cutin durch zwei verschieden gewonnene Extrakte aus *Penicillium spec.* und deren Kombination.

Enzymlösung	Trocken-Gewicht	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$
Wasser-Extrakt ( $E_1$ )	3,8	Hydrolysat	27	16	2,55	0,67
		Cutin		28	0	0
Puffer-Extrakt ( $E_2$ )	4,7	Hydrolysat	56	45	0,44	0,094
		Cutin		49	0,26	0,056
Kombination ( $E_1 + E_2$ )	8,5	Hydrolysat	38	11	6,48	0,76
		Cutin		12	5,70	0,67

Das Enzym, das die Aufspaltung des Cutins bewirkt, wird im folgenden mit allem Vorbehalt als "Cutinase" bezeichnet. Dieser Begriff dient lediglich zur Vereinfachung und soll nichts darüber aussagen, ob es sich dabei um ein Enzym handelt oder einen Enzymkomplex; auch in Bezug auf die Natur des Enzyms soll damit nichts festgelegt werden, denn da über den chemischen Aufbau des Cutins nichts Sicheres bekannt ist, kann es sich dabei sowohl um ein Enzym handeln

welches Esterbindungen aufspaltet (sofern man unter "Cutin" Polyester von Oxyfettsäuren versteht), als auch eine Lyase welche Äther- oder Peroxybrücken spaltet (wenn man annimmt, daß die Fettsäuren des Cutins auf diese Weise vernetzt sind).

Da es bei der schwachen Aktivität wenig aussichtsreich erschien, den Ablauf der Reaktion durch Bestimmung der End- oder Zwischenprodukte zu verfolgen, wurde im folgenden die Dehydrierungsreaktion als Maß zur Bestimmung der Aktivität der Cutinase herangezogen. Die Methode ist natürlich nur begrenzt anwendbar, denn da nicht sicher ist, zu welchem Zeitpunkt die Dehydrierung im Laufe des Abbaus stattfindet, ist es z.B. möglich, daß bei bestimmten Extraktionsverfahren eine Aktivitätssteigerung der Cutinase nur deshalb nicht erkannt werden kann, weil möglicherweise ein Enzym, das nach der Spaltung durch die Cutinase diese Spaltprodukte weiter abwandelt, nicht zugleich mit erfaßt wird. Andererseits kann die Spaltungsreaktion auch nur so lange mittels der Dehydrierungsreaktion verfolgt werden, als die Aktivität der Dehydrase höher ist als die der Cutinase.

a. Bestimmung des optimalen Extraktions-pH-Wertes

Dazu wurde das Mycel von *Penicillium spec.* nach der Extraktion mit Wasser mit m/5 Acetat-, Phosphat-, oder Borat-Puffer von pH 5,6, 6,0, 6,8, 7,4, 7,9 und 8,3 (mit Überschneidungen in den kritischen Bereichen) extrahiert und die Aktivität der einzelnen Extrakte unter

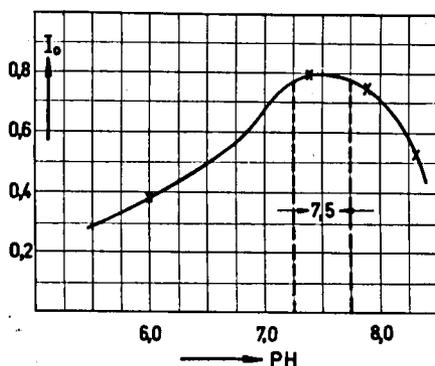


Fig. 2. Abhängigkeit der "Cutinase"-Aktivität vom Extraktions-pH-Wert. (Indirekter Nachweis durch Bestimmung der Dehydrierungsintensität des Wasser- (= Dehydrase)-Extraktes in Thunberg-Ansätzen.

gleichzeitigem Zusatz von dehydrase-haltigem Wasserextrakt geprüft. Das Ergebnis ist in Fig. 2 wiedergegeben: Der optimale Extraktionsbereich liegt zwischen pH 7,25 und 7,75; zur alkalischen Seite hin fällt die Aktivität rascher ab als zur sauren Seite.

b. Alterung und Dialyse

Im Laufe der Versuche zeigte sich, daß der Pufferextrakt bedeutend stabiler war als der Wasserextrakt. Nach 48-stündiger Aufbewahrung des Pufferextraktes bei +5° war die Aktivität der Cutinase erst um 45 % gesunken. Ein mit Phosphatpuffer von pH 7,6 gewonnener Extrakt aus *Penicillium spec.* wurde daher 3 Stdn. bei +5° gegen dest. Wasser dialysiert und anschließend die Aktivität des Extraktes in

Kombination mit dem Dehydrase-Extrakt bestimmt (Tab. 4). Zum Vergleich wurde auch der Wasserextrakt dialysiert und dessen Einfluß auf die Aktivität untersucht. Zur Kontrolle lief ein Ansatz mit Pufferextrakt mit, der 10 Min. im siedenden Wasserbad gehalten worden war. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Cutinase beständig gegen Dialyse und benötigt also keine dialysablen Cofaktoren. Weitere Versuche ergaben, daß auch nach 6-stündiger Dialyse nur ein geringer Aktivitätsverlust (28 %) festzustellen ist, der wohl auf eine beginnende Schädigung des Enzymeiweiß zurückzuführen ist.

TABELLE IV

Einfluß der Dialyse auf die Aktivität des Wasserextraktes und des Pufferextraktes aus *Penicillium spec.* mit Cutin-Fettsäuren und Cutin als Substrat.  
(Dialyse: 3 Stdn. gegen dest. Wasster bei + 5°).

Enzymlösung	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$
Wasser- Extrakt ( $E_1$ )	Hydrolysat	27	13	4,00	0,76
	Cutin		29	0	0
Puffer- Extrakt ( $E_2$ )	Hydrolysat	69	74	0	0
	Cutin		65	0,09	0,02
Kombination ( $E_1 + E_2$ )	Hydrolysat	35	9,5	7,65	0,81
	Cuttin		7	11,45	1,22
$E_1$ dialysiert	Hydrolysat	41	37	0,26	0,03
	Cutin		44	0	0
$E_2$ dialysiert	Hydrolysat	65	65	0	0
	Cutin		55	0,28	0,03
$E_2 + E_1$ -dia- lysiert	Hydrolysat	52	50	0,08	0,01
	Cutin		47	0,20	0,02
$E_1 + E_2$ -dia- lysiert	Hydrolysat	37	10	7,30	0,78
	Cutin		6	13,90	1,48
$E_1 + E_2$ -(er- hitzt auf 100°)	Hydrolysat	23	9	6,75	0,72
	Cutin		23	0	0

### c. Zur Zeitabhängigkeit der Cutinase-Wirkung

Zur Klärung der Frage, ob die Dehydrierungsintensität des Wasserextraktes von der Einwirkungsdauer des Pufferextraktes abhängig ist, wurden Leer- und Substratansätze mit dem Pufferextrakt verschieden lange im Wasserbad bei 30° gehalten, dann die Dehydraselösung zugesetzt und die Dehydrierungsintensität bestimmt. Der Vergleich mit der Dehydrierungsintensität die bei der direkten Zugabe der Dehydraselösung erreicht wird (also Einwirkung der Cutinaselösung = 0 Min.) ergab, daß die Intensität der Dehydrierung mit der Länge der Einwirkungszeit der Cutinaselösung bis zur Erreichung eines Optimums ansteigt (Fig. 3). Da die zum Vergleich mitlaufenden Ansätze mit Stearinsäure als Substrat keinen Intensitätsanstieg zeigten, deren Dehydrierung also unabhängig von der Einwirkung der Cutinase ist, ergibt sich daraus einerseits, besonders da beide Substrate in vergleichbarer Konzentration vorlagen, daß es sich bei den beobachteten Effekten nicht um die Dehydrierung eventuell im Cutin vorhandener freier Fettsäuren handelt, deren Dehydrierung von einer vorherigen Spaltung unabhängig sein müßte, und andererseits, daß der enzymatische Cutinabbau durch eine Spaltungsreaktion eingeleitet wird.

Die Tatsache, daß nach etwa 30-minütiger Einwirkung ein Optimum erreicht wird, nach dem die Dehydrierungsintensität nicht mehr ansteigt, ist wohl darauf zurückzuführen, daß zu diesem Zeitpunkt die Aktivitätsgrenze der Dehydrase erreicht ist.

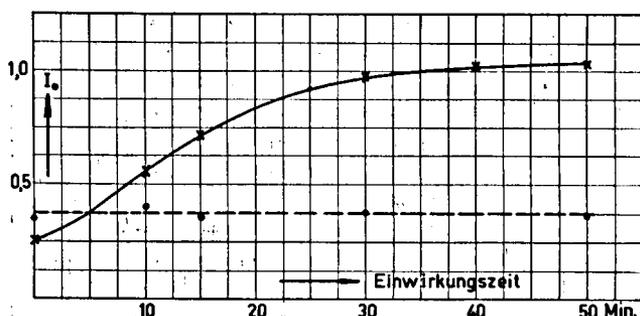


Fig. 3. Einfluß der Einwirkungsdauer der Cutinaselösung auf die Intensität der nachfolgenden Dehydrierung.

x—x = 3 mg Cutin/Ansatz

•----• = m/150 (= 5,5 mg) Stearat/Ansatz

Die recht geringe Aktivität der Dehydrase ergab sich auch aus folgenden Versuchen: Hält man die Konzentration der Dehydrase im optimalen Bereich (2,1–8,3 mg/Ansatz) konstant und setzt steigende Mengen Cutinaselösung zu, so ergibt sich eine Steigerung der Dehydrierungsintensität in einem Bereich von 1,3–5,4 mg Cutinaselösung (Enzymtrockengewicht) pro Ansatz. Bei weiterer Konzentrationserhöhung steigt die Dehydrierungsintensität nicht mehr an und bei sehr hohen Konzentrationen ist sogar ein Aktivitätsabfall zu erkennen. Das bedeutet, daß durch die Cutinase so viel Substrat für die Dehydrase freigesetzt wird, daß ihre Aktivität zur Dehydrierung desselben nicht mehr ausreicht und schließlich durch den Substratüberschuß eine Schädigung des Dehydrierungsenzyms bzw. eine Blockierung oder Hemmung eintritt.

## 2. Nachweis mittels der Warburg-Methodik

In aeroben Versuchen ergab sich, daß sowohl die durch Extraktion des Mycels von *Penicillium spec.* mit Wasser als auch mit Puffer von pH 7,6 erhaltenen Lösungen das Cutin zu oxydieren vermögen (Fig. 4). Der bei den anaeroben Versuchen erhaltene Befund, daß die beiden Lösungen verschiedene Empfindlichkeit gegen Dialyse besitzen, konnte in diesen Versuchen bestätigt werden: Nach 4-stündiger Dialyse sinkt die Aktivität des Pufferextraktes um etwa 26 % ab, wobei insbesondere die Anfangsgeschwindigkeit der Oxydationsreaktion verringert ist, während die Aktivität des Wasserextraktes auf etwa 10 % der Ausgangsaktivität zurückgeht.

Zur Prüfung der Frage, ob auch unter aeroben Bedingungen eine Abhängigkeit der Cutinasewirkung von der Einwirkungszeit gegeben ist, wurde zu Leer- und Substratansätzen mit Pufferextrakt nach resp. 10, 20 oder 40 Min. der Wasserextrakt aus dem Seitenarm zugekippt und der Verlauf der Oxydation verfolgt. Es ergab sich, daß die Intensität der Oxydation in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit der Cutinase zunimmt (Fig. 5). Auch hier verläuft der Aktivitätsanstieg nicht linear, sondern nimmt mit zunehmender Dauer der Inkubationszeit langsam ab.

Da das Primärenzym der Cutinspaltung im Pufferextrakt vorliegt, wurde der Wasserextrakt zunächst nicht weiter untersucht und die folgenden Versuche am Pufferextrakt ausgeführt. Orientierende Versuche ergaben, daß die Aktivität gegenüber Cutin bei Fällung der Eiweiße mit Ammonsulfat bei 80 %iger Sättigung erhalten bleibt (Fig. 6), und daß bei fraktionierter Fällung in verschiedenen Frak-

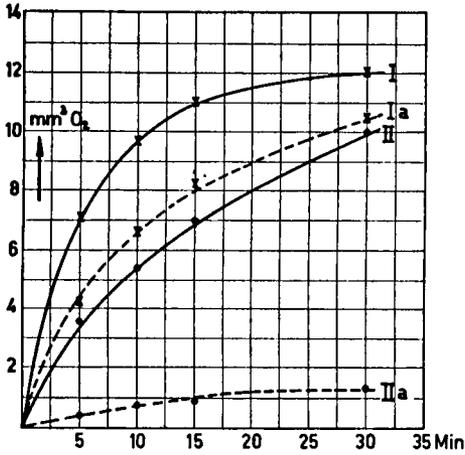


Fig. 4

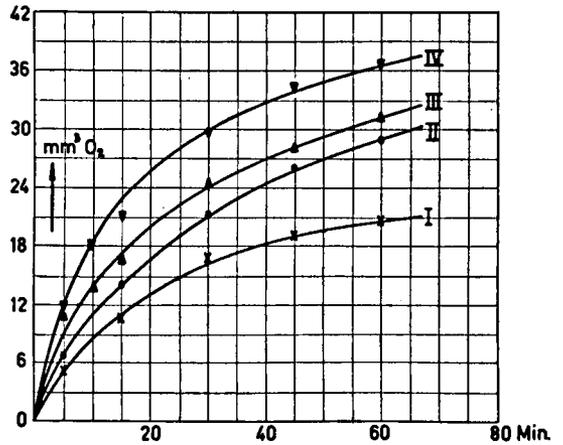


Fig. 5

Fig. 4. Cutin-Oxydation durch Pufferextrakt (I) und Wasserextrakt (II) aus *Penicillium spec.*  
Abfall der Aktivität nach 4-stündiger Dialyse gegen dest. Wasser beim Pufferextrakt (Ia) und beim Wasserextrakt (IIa).

Fig. 5. Cutin-Oxydation bei Zugabe des Wasserextractes nach 0 (I), 10 (II), 20 (III) oder 40 (IV) Minuten.

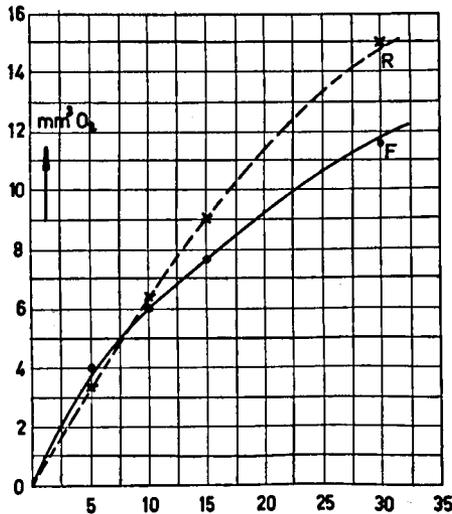


Fig. 6. Oxydation von Cutin durch den Rohextract aus *Penicillium spec.* (R) und die daraus bei 80 %iger Sättigung mit Ammonsulfat erhaltene Fällung (F).

tionen Aktivität nachweisbar ist. Aus den bisherigen Ergebnissen ist jedoch noch nicht mit Sicherheit zu schließen, ob mehrere Enzyme am Cutinabbau beteiligt sind und welches für den ersten Angriff des Substrates verantwortlich ist.

### III. Einige Spezifitätsversuche

Da bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob im Cutin gesättigte, ungesättigte oder oxydierte Fettsäuren vorliegen (Literatur s. Einleitung), schien es sinnvoll, die Aktivität des cutinasehaltigen Extraktes gegenüber verschiedenen Substraten zu prüfen. Dazu mußte jedoch zunächst die Substratspezifität der Dehydrase bekannt sein und in Thunberg-Versuchen ergab sich, daß praktisch nur gesättigte höhere Fettsäuren angegriffen werden, aber auch Oxyfettsäuren dehydriert werden, ähnlich der von FRANKE und HEINEN (1958) in *Aspergillus niger* und *Rhizopus tonkinensis* nachgewiesenen Schimmelpilz-Dehydrase. Von den ungesättigten Fettsäuren der C//I-Reihe wird, wie Tab. 5 zeigt, nur die Ölsäure noch sehr schwach dehydriert, während Linol- und Linolensäure nicht als H-Donatoren dienen können.

TABELLE V

Dehydrierung gesättigter höherer Fettsäuren sowie Oxyfettsäuren und C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit steigender Anzahl Doppelbindungen durch die Fettsäure-Dehydrase aus *Penicillium spec.*

Substrat	t <sub>0</sub>	t	I	I <sub>0</sub>
Myristinsäure . . . . .		11	5,25	0,94
Palmitinsäure . . . . .		12	4,48	0,80
Stearinsäure . . . . .		11	5,25	0,94
Ölsäure . . . . .	26	17	2,03	0,36
Linolsäure . . . . .		29	0	0
Linolensäure . . . . .		30	0	0
α-Oxystearinsäure . . . .		16	2,40	0,43
9, 10-Dioxystearinsäure . .		21	0,91	0,16

Nachdem in aeroben Versuchen dann zunächst festgestellt wurde, daß alle verwendeten Substrate, nämlich Stearinsäure, α-Oxystearinsäure, 12-Oxystearinsäure, 9,10-Dioxystearinsäure und Ölsäure durch den cutinasehaltigen Extrakt angegriffen werden, wurde anschließend in anaeroben Ansätzen die Dehydrierbarkeit der genannten Substrate in Gegenwart beider Extrakte geprüft. Wie aus Fig. 7 zu ersehen ist, werden bei Zusatz der Dehydraselösung nach 10 Min. langer Inkubation der Substrate mit der Cutinaselösung die beiden Monoxyverbindungen besser angegriffen als die unsubstituierte Stearinsäure und die übrigen Substrate. Dieser Effekt wird nach 1-stündiger Inkubation noch deutlicher: Die Aktivität gegenüber der α-Oxystearinsäure und dem Cutin erhöht sich in etwa gleichem Maße und außerdem ist die Aktivität gegenüber der 12-Oxystearinsäure stark erhöht; bei den anderen Substraten fehlt eine derartige Steigerung entweder vollständig oder liegt innerhalb der Fehlergrenze. Wenngleich hieraus nicht auf das Vorkommen derartiger Oxyfettsäuren im

Cutin geschlossen werden kann, so ist es doch wahrscheinlich, daß solche Verbindungen bevorzugte Substrate der am Cutinabbau beteiligten Enzyme darstellen und im Laufe der Abbauprozesse auftreten.

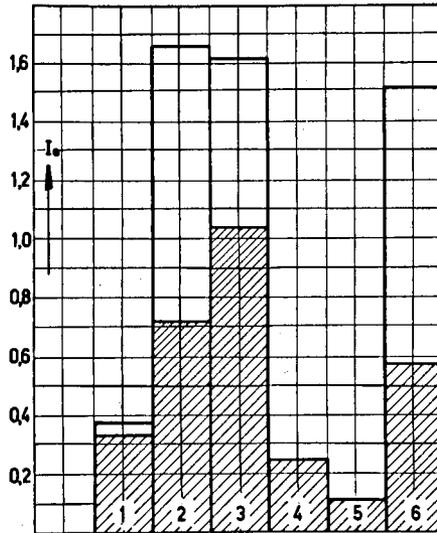


Fig. 7. Aktivität des cutinasehaltigen Extraktes aus *Penicillium spec.* gegenüber verschiedenen Oxyfettsäuren sowie Stearinsäure, Ölsäure und Cutin. (Schraffierte Stapel = Inkubationszeit 10 Min.).

- |                               |                             |
|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 = Stearinsäure              | 4 = 9, 10-Dioxystearinsäure |
| 2 = $\alpha$ -Oxystearinsäure | 5 = Ölsäure                 |
| 3 = 12-Oxystearinsäure        | 6 = Cutin                   |

#### IV. Zur Verbreitung cutinspaltender Enzyme

In anaeroben Versuchen wurde die Aktivität von Pufferextrakten aus *Fusarium moniliforme* und *Rhodotorula glutinis* gegenüber dem Cutin mit den bisherigen Extrakten aus *Penicillium spec.* verglichen und zwar wie in früheren Versuchen bei verschiedenen langen Inkubationszeiten. Wie Fig. 8 zeigt, ist die Aktivität der Cutinase aus *Fusarium moniliforme* (II) verglichen mit der aus *Penicillium spec.* (I) sehr schwach; die Aktivität des *Rhodotorula*-Extraktes liegt dagegen etwa 1,7 mal höher (III). Bei Kombination des *Rhodotorula*-Extraktes mit der Dehydrase aus *Penicillium spec.* (IV) ergab sich eine weitere Aktivitätssteigerung. In weiteren Versuchen wurde eine Reihe von Laboratoriumsstämmen, darunter *Aspergillus clavatus*, *A. tamarii*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium claviforme* und *P. notatum* auf ihren Gehalt an Cutinase untersucht, doch war bei keinem der genannten Stämme eine Aktivität nachweisbar.

#### V. Direkter Nachweis der Cutinspaltung

Bei der Untersuchung der Änderung der Eigenschaften des Cutins wenn es als Nährsubstrat für *Penicillium spec.* verwendet wird zeigte sich, daß sich nicht nur die mechanischen Eigenschaften ändern, wobei

aus dem harten, elastischen Material eine weiche, gummöse Masse wird, sondern auch die Löslichkeit. Cutin ist normalerweise auch in konzentriertem Alkali unlöslich und kann nur durch längeres Kochen in alkoholischem Alkali oder in absol. Alkohol mit  $K_2CO_3$  langsam hydrolysiert werden. Das vier bis fünf Wochen als Nährsubstrat verwendete Cutin ist hingegen in warmem, verdünnten Alkali (15 %ige KOH oder NaOH) teilweise leicht löslich.

Zur genaueren Prüfung wurden je 2 mg unbehandeltes und angegriffenes Cutin 30 Min. in absol. Alkohol unter Zusatz von  $K_2CO_3$  am Rückfluß gekocht und anschließend die Menge der in Lösung

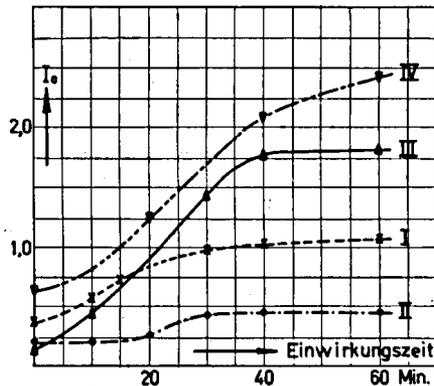


Fig. 8. Cutinase-Gehalt von Extrakten aus verschiedenen Pilzen (vgl. Text).

gegangenen Fettsäuren bestimmt. Es ergab sich, daß in der kurzen Zeit vom vorbehandelten (enzymatisch angegriffenen) Material bereits 47 % in Lösung gegangen waren, während beim Kontrollansatz nur 0,8 % des Ausgangsmaterials gelöst waren.

Aus dem Ergebnis ist zu schließen, daß durch die Einwirkung der Pilzenzyme die chemischen Eigenschaften des Cutins grundlegend verändert werden. Ob es sich dabei um eine Hydrolyse unter Aufspaltung von Esterbindungen, oder um die Lösung von Sauerstoffbrücken handelt, läßt sich hieraus allerdings nicht entscheiden. Immerhin bietet sich auf diese Weise die Möglichkeit, die recht rohe Methode der Aufspaltung des Cutins auf chemischen Wege, wobei die Bildung von Artefakten nicht ausgeschlossen werden kann, durch eine enzymatische Lyse zu ersetzen. Nach papierchromatografischer Auftrennung und Bestimmung der Spaltprodukte wird es leichter sein, Einblick in die beim enzymatischen Abbau des Cutins zu erwartenden Reaktionen zu erhalten.

#### SUMMARY

1. *Penicillium spec.*, a mould isolated from rotting leaves, is able to grow on a culture medium with cutin as the only carbon source. Hence the fungus contains enzymes which are able to destroy cutin.

2. While the mould-enzymes were acting upon the cutin, the resulting variations of the nutritional substrate were followed with certain intervals as well by roentgen microscopical examinations as by replica technique; the phenomenons of breakdown could be demonstrated by means of photographs.

3. The change in mechanical properties caused by the enzymes of the fungus are also apparent macorscopically, moreover the insoluble cutin is converted into a form that is easily soluble in diluted warm alkali.

4. By means of Thunberg technique in water extracts of *Penicillium spec.* a dehydrogenase could be demonstrated which is able to dehydrogenate fatty acids obtained by chemical hydrolysis of cutin. Some properties of these dehydrogenase were investigated.

5. Using the dehydrogenase reaction as an assay, in extracts of *Penicillium spec.* with phosphate buffer the presence of an enzyme could be demonstrated that makes cutin readily attackable by the dehydrogenase by liberating free fatty acids from the polymere compound. The preliminary term "cutinase" is proposed for this enzyme.

6. Some properties of the "cutinase" were determined under aerob and anaerob conditions and the stability of the enzyme against dialysis as well as the possibility of precipitation with ammonium sulfate were established. There are indications that preferably monohydroxy stearic acids are used as a substrate by this enzyme.

7. Some results point to the fact that in buffered extracts of *Penicillium spec.* several enzymes are present taking part in the breakdown of cutin; probably "cutinase" consists of more than one enzyme.

8. Low "cutinase" activity could be demonstrated also in *Fusarium moniliforme* and higher activity in a yeast, *Rhodotorula glutinis*.

Herrn Professor Dr. H. F. Linskens (Nijmegen) danke ich für den Hinweis auf das Problem, anregende Diskussionen und die ständige Förderung meiner Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. W. Franke (Köln) für wertvolle experimentelle Vorschläge und Literaturhinweise, sowie die freundliche Überlassung von Oxyfettsäure-Präparaten. Herrn M. M. A. Sassen danke ich für die Isolierung des *Penicillium*stammes. Für experimentelle Hilfe danke ich Fräulein. I. van den Brand, für die Röntgenaufnahmen Herrn M. van den Donk und für die Ausführung der fotografischen Arbeiten Herrn H. J. M. Spruit.

#### LITERATUR

- ALEXEJEW, W. A. 1956. *Mikrobiologija* (Leningrad) **25**: 327.  
 ANDERSON, D. B. 1928. *Jb. wiss. Bot.* **69**: 501.  
 BERGSTRÖM, H. 1945. *Ark. Kemi, Mineral. o. Geol. (A)* **21**: Nr. 15.  
 BIRKINSHAW, J. H. und P. CHAPLEN. 1955. *Biochem. J.* **60**: 255.  
 ———, ——— und W. K. FINDLAY. 1957. *Biochem. J.* **66**: 188.  
 BOLLIGER, R. 1959. *J. Ultrastructure Res.* **3**: 105.  
 CARR, L. B. 1958. *J. Bacteriol.* **76**: 119.  
 CHIPAULT, J. R. 1952/53. *Ann. Report of Hormel Inst., Minnesota, USA.*  
 CHRIST, B. 1959. *Z. Bot.* **47**: 88.  
 COOKE, W. B. 1957. *Tappi* **40**: 301.  
 DAVENPORT, J. B. 1956. *Austral. J. Chemistry* **9**: 416.  
 DUPONT, G., R. DULOUE und A. CHICOISNE. 1956. *Bull. Soc. chim. France* **5**: 1413.  
 ESAU, K. 1953. *Plant Anatomy*, New York, 735.  
 ECHAUDI, E., S. D. VAN GUNDY und J. C. WALKER. 1957. *Phytopathology* **47**: 549.  
 FAHRAEUS, G. 1947. *Symb. bot. Upsaliensis* **9**: 1.  
 FARKASDI, G. 1958. *Dtsch. Landwirtschaft.* **9**: 69.  
 FORSYTH, W. G. C., A. C. HAYWARD und J. B. ROBERTS. 1958. *Nature (London)* **182**: 800.  
 FRANKE, W. 1951. *Erg. Enzymforsch.* **12**: 89.  
 ——— und H. FREHSE. 1953. *Hoppe-Seylers Z.* **295**: 334.  
 ——— und ———. 1957. *Hb. Pflanzenphysiol. VII*, 137 (Berlin-Göttingen-Heidelberg).  
 ——— und W. HEINEN. 1958. *Arch. Mikrobiol.* **31**: 359.  
 ———, J. MÖNCH, D. KIBAT und A. HAMM. 1948. *Liebigs Ann. Chem.* **559**: 221.

- FRÉMY, E. 1859. C. R. Acad. Sci. (Paris) **48**: 667.  
 ———. 1881. *ibid.* **92**: 926.  
 ———. 1885. *ibid.* **100**: 19.  
 FREY-WYSSLING, A. 1935. Stoffausscheidung. d. höheren Pflanz. 81 (Berlin).  
 ———. 1953. Submicroscopic Morphol. Protoplasma (Amsterdam).  
 FREYTAG, K. 1957. *Planta* **50**: 41.  
 FRITZ, F. 1935. *Jb. wiss. Bot.* **81**: 718.  
 FULTON, J. P. 1948. *Phytopathology* **38**: 235.  
 GAERTNER, A. 1959. *Arch. Mikrobiol.* **32**: 261.  
 GÄUMANN, E. 1951. *Pflanzl. Infektionslehre*, 2. Aufl. (Basel).  
 GERRETSEN, F. C. 1957. Vortrag, AKA-Tagung (Düsseldorf).  
 GRETSCHUSCHNIKOW, A. J. und N. N. JAKOWLEWA. 1951. *Ber. Akad. Wiss. USSR* **76**: Nr. 2.  
 GOTO, M. und N. OKABE. 1958. *Nature (London)* **182**: 1516.  
 HÄRTEL, O. 1950. *Biol. gen.* **19**: 193.  
 HAYWARD, A. C., W. G. C. FORSYTH und J. B. ROBERTS. 1959. *J. gen. Microbiol.* **20**: 510.  
 HEINEN, W. 1960. *Schweiz. Z.f. Hydrol.*  
 ——— und H. F. LINSKENS. 1960. *Naturwiss.* **47**: 18.  
 HILKENBÄUMER, F. 1958. *Z. Naturforsch.* **13b**: 666.  
 HOLMAN, R. T. 1948. *Arch. Biochemistry* **17**: 459.  
 HUELIN, F. E. und R. A. GALLOP. 1951. *Austral. J. Sci. Res., Ser. B* **4**: 526 u. 533.  
 HUSAIN, A. und A. KELMAN. 1958. *Phytopathology* **48**: 377.  
 ——— und S. RICH. 1958. *Phytopathology* **48**: 314.  
 JUNIPER, B. E. 1959. *Endeavour* **18**: 20.  
 ——— und D. E. BRADLEY. 1958. *J. Ultrastructure Res.* **2**: 16.  
 KAUFMANN, H. P. 1958. *Analyse d. Fette u. Fettprodukte* **1**, 213 (Berlin-Göttingen-Heidelberg).  
 KERTESZ, Z. J. 1951. in *Summer-Myrbäck: The Enzymes* **1**, 2, 745 (New York).  
 KHAN, N. A. 1953. *Arch. Biochem. Biophys.* **44**: 247.  
 ———. 1955. *Biochim. Biophys. Acta* **16**: 159.  
 ———, W. O. LUNDBERG und R. T. HOLMAN. 1954. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**: 1779.  
 KILPATRICK, R. A. 1959. *Phytopathology* **49**: 148.  
 KOHLMAYER, J. 1956. *Phytopathol. Z.* **27**: 147.  
 ———. 1958. *Holz als Roh- u. Werkstoff* **16**: 215.  
 KOLJO, B. 1957. in E. Treiber: *Die Chemie d. Pflanzenzellwand* (Berlin-Göttingen-Heidelberg).  
 KROH, M. 1956. *Z. ind. Abst. u. Vererbungsl.* **87**: 365.  
 LEE, B. 1925. *Ann. Bot.* **39**: 755.  
 LEGG, V. H. und R. V. WHEELER. 1925. *J. Chem. Soc. (London)* **127**: 1412.  
 ——— und ———. 1929. *ibid.* **131**: 2444.  
 LEMOIGNE, M., B. DELAPORTE und M. CROSON. 1944. *Ann. Inst. Pasteur* **70**: 224.  
 LINSKENS, H. F. 1950. *Planta* **38**: 591.  
 ———. 1952. *Planta* **41**: 40.  
 ———. 1955. *Z. Bot.* **43**: 1.  
 ———. 1958. *Fortschr. d. Bot.* **20**: 266.  
 ———. 1959. *Proc. IX. Intern. bot. Congr. (Montreal)* im Druck.  
 MACRAE, R. M. und J. F. WILKINSON. 1958. *J. gen. Microbiol.* **19**: 210.  
 MATIC, M. 1956 a. *Biochem. J.* **63**: 168.  
 ———. 1956 b. *South-Afr. Industr. Chem.* **10**: 311.  
 MEARA, M. L. 1955. in K. Paech u. H. V. Tracey: *Moderne Methoden d. Pflanzenanalyse* **2**: 392 (Berlin-Göttingen-Heidelberg).  
 MEYER, F. H. 1959. *Arch. Mikrobiol.* **33**: 149.  
 MEYER, H. 1938. *Protoplasma* **29**: 552.  
 MILLER, H. N. 1949. *Phytopathology* **39**: 403.  
 MUELLER, L. H., P. H. CARR und W. E. LOOMIS. 1954. *Amer. J. Bot.* **41**: 593.  
 MUKHERJEE, S. 1951. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**: 364.  
 ———. 1952. *ibid.* **35**: 23.  
 MYOSHI, H. 1895. *Jb. wiss. Bot.* **28**: 269.  
 ORGELL, W. H. 1955. *Plant Physiol.* **30**: 78.

- OVERBEEK, J. VAN. 1956. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **7**: 355.
- PRIESTLEY, J. H. 1943. *Bot. Rev.* **9**: 539.
- PRISTOU, R. und M. E. GALLEGLY. 1954. *Phytopathology* **44**: 81.
- PRIVETT, O. S., CH. NICKELL, W. E. TOLBERG, R. F. PASCHKE, D. E. WHEELER und W. O. LUNDBERG. 1954. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **31**: 23.
- und ———. 1956. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **33**: 156.
- PURDY, L. H. 1958. *Phytopathology* **48**: 605.
- RAWLINS, T. E. und W. N. TAKAHASHI. 1952. *Techniques of Plant Histochem. Virol.* 125 (National Press, Calif.).
- REESE, E. T., W. GILLIGAN und B. NORKRANS. 1952. *Physiol. Plantarum* (Kopenhagen) **5**: 379.
- ROELOFSEN, P. A. 1952. *Acta botan. Neerl.* **1**: 99.
- SCHAEFER, A. C. 1957. *Ber. schweiz. bot. Ges.* **67**: 218.
- SCHREIL, W. 1955. *Mikroskopie* (Wien) **10**: 38.
- SCHWEIZER, H. 1958. *Phytopathol. Z.* **33**: 55.
- SCOTT, F. M., K. C. HAMNER, E. BAKER und E. BOWLER. 1956. *Amer. J. Bot.* **43**: 243.
- , ——— und ———. 1957. *Science* **125**: 399.
- und M. LEWIS. 1953. *Botan. Gaz.* **114**: 253.
- SEARS, E. R. 1937. *Genetics* **22**: 130.
- SLOVER, H. T. und L. R. DUGAN. 1958. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **35**: 350.
- SKOSS, J. D. 1955. *Botan. Gaz.* **117**: 55.
- SIDDIQI, A. M. und A. L. TAPPEL. 1956. *Arch. Biochem. Biophys.* **60**: 91.
- SINGH, R. K. und R. K. S. WOOD. 1956. *Ann. Bot. NS.* **20**: 89.
- SITTE, P. 1955. *Mikroskopie* (Wien) **10**: 178.
- . 1957. in E. Treiber: *Die Chemie d. Pflanzenzellwand* (Berlin-Göttingen-Heidelberg).
- SIU, R. G. H. 1954. *Transact. New York Acad. Sci., Ser. 2* **17**: 37.
- und R. T. REESE. 1953. *Bot. Rev.* **19**: 377.
- STÖCKLI, A. 1954. *Straße u. Verkehr* **40**: 133.
- SUCHOROW, K. T. 1958. *Beitr. z. Physiologie d. pflanzl. Resistenz* (Berlin).
- SÜLLMANN, H. 1943. *Helv. chim. Acta* **26**: 2253.
- TATEBE, T. 1939. *J. Hort. Assoc. Jap.* **10**: 62.
- TREIBER, E. 1955. in *Hb. Pflanzenphysiol. I*, 688 (Berlin).
- . 1957. *Die Chemie d. Pflanzenzellwand* (Berlin-Göttingen-Heidelberg).
- WIERINGA, K. T. 1955. *Z. Pflanzenernähr., Düng. u. Bodenk.* **69**: 150.
- WILLIAMSON, D. H. und J. F. WILKINSON. 1958. *J. gen. Microbiol.* **19**: 198.
- WOOD, R. K. S. 1955. *Ann. Bot. NS.* **19**: 1.
- und S. C. GUPTA. 1958. *Ann. Bot. NS.* **22**: 309.
- YARWOOD, C. E. 1957. *Bot. Rev.* **23**: 235.
- ZETSCHKE, F. 1932. in *Hb. Pflanzenanalyse III*, 1, 217 (Wien).