

ÜBER DEN ENZYMATISCHEN CUTIN-ABBAU

II. MITTEILUNG: EIGENSCHAFTEN EINES CUTINOLYTISCHEN ENZYMS AUS PENICILLIUM SPINULOSUM THOM

WOLFGANG HEINEN

unter technischer Mitarbeit von

INGEBORG VAN DEN BRAND

(*Botanisches Institut der R.K. Universität Nymwegen, Niederlande*)

(*eingegangen am 13. Februar 1961*)

I. EINLEITUNG

Ein wesentlicher Bestandteil der aus verschiedenen Schichten aufgebauten pflanzlichen Kutikula ist das *Cutin*, welches im allgemeinen, auf die Cellulose- und Pectinschicht folgend, die äußere Begrenzung gegenüber der atmosphärischen Umwelt darstellt, sofern man von den aufgelagerten Wachsstrukturen absieht (FREY-WYSSLING 1953, ROELOFSEN 1952, 1959, KOLJO 1957, SITTE 1955, 1957, JUNIPER u. BRADLEY 1958, JUNIPER 1959, BANCHER, HÖLZL u. KLIMA 1960). Die dem Suberin und Sporopollenin verwandte Substanz besteht aus vernetzten, hochpolymeren Fettsäuren oder Oxyfettsäuren (ZETSCHKE 1932, FREY-WYSSLING 1953, TREIBER 1955, 1957, MATIC 1956), deren Entstehung aus flüssigen Vorstufen wenngleich nicht bewiesen, so doch zumindest wahrscheinlich gemacht werden konnte (PRIESTLEY 1943, LINSKENS 1950, 1952, SITTE 1955, SIDDIQI u. TAPPEL 1956, BOLLIGER 1959). Bei der Verrottung und Humifizierung pflanzlichen Materials (WIERINGA 1955, FARKASDI 1958, MEYER 1959) tritt offensichtlich auch eine vollständige Destruktion des Cutins ein. Auch verschiedene Beobachtungen beim Eindringen phytopathogener Keime in die Wirtspflanze sprechen für eine dabei eintretende Lyse des Cutins (FULTON 1948, MILLER 1949, YARWOOD 1957, SCHWEIZER 1958, TENERINI u. LOPRIENO 1960). Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang der Befund von LOPRIENO u. TENERINI (1959), daß die durch *Cycloconium oleaginum* verursachten Infektionsstellen bei Olivenblättern vor makroskopischem Erscheinen des Krankheitsbildes dadurch sichtbar gemacht werden können, daß man ein Blatt, bei dem eine Infektion vermutet wird, in eine 5 %ige NaOH von 50–60° C. eintaucht. Die Beobachtung, daß sich bei dieser Behandlung an den Penetrationsstellen dunkle Flecken bilden ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß dort durch Enzymeinwirkung aus dem Cutin freie verseifbare Fettsäuren entstanden sind. Eine Destruktion des Cutins ist gleichermaßen auch für einen anderen Eindringungsvorgang, das Durchwachsen der Pollenschläuche durch die Narben-

kutikula bei Cruciferen (CHRIST 1959) anzunehmen. Dennoch wurde das Cutin bislang als enzymatisch nicht angreifbares Material angesehen (GÄUMANN 1957, TREIBER 1957, ROELOFSEN 1959). Während MILLER (1949) erstmals die Existenz cutinlösender Enzyme für sehr wahrscheinlich erachtete, konnte kürzlich (HEINEN u. LINSKENS 1960, HEINEN 1960) das Vorhandensein eines derartigen Enzyms in *Penicillium spinulosum* eindeutig nachgewiesen werden. Das Enzym, das die vorläufige Bezeichnung "Cutinase" erhielt, läßt sich mit Phosphatpuffer aus dem Mycel extrahieren, es kann mit Ammonsulfat ausgefällt werden und erwies sich als beständig gegen kurze Dialyse. Die Cutinase wurde bisher nur indirekt, nämlich durch die Bestimmung der Dehydrierung beim weiteren Abbau der durch das Primärenzym freigesetzten Cutin-Fettsäuren nachgewiesen. Die Beobachtung, daß durch die Einwirkung der Pilzenzyme das Cutin in verdünntem Alkali teilweise löslich wurde (HEINEN 1960) bot jedoch eine Möglichkeit zur direkten Verfolgung des Cutin-Abbaus. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung ergaben, daß die durch die enzymatische Cutinolyse entstehenden freien Fettsäuren im umgebenden wässrigen Medium der Versuchsansätze nicht in Lösung gehen, daß jedoch bei anschließender Einwirkung verdünnten Alkalis die freien Säuregruppen mit der verwendeten Lauge reagieren. Bei Verwendung einer Kali- oder Natronlauge bekannter Normalität ergibt die Titration der nicht verbrauchten Lauge mit HCl die Menge an freien Fettsäuren, die unter Seifenbildung mit dem Alkali reagiert haben. Die aus einer bestimmten Menge Cutin unter verschiedenen Bedingungen freigesetzte Fettsäuremenge gibt wiederum Aufschluß über die Aktivität der verwendeten Enzymlösung. In der vorliegenden Arbeit wird einerseits die Cutinolyse unter der Einwirkung von Extrakten aus *P. spinulosum* mittels der Titrationsmethode durch Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren verfolgt, andererseits werden auf diese Weise die optimalen Bedingungen für die Wirkung der Cutinase sowie einige Eigenschaften des Enzyms untersucht.

II. METHODIK

1. Pilzmaterial und Züchtung

Zu den Versuchen wurde der von rottenden Blättern isolierte Schimmelpilz *Penicillium spinulosum* Thom (früher als *P. spec.* bezeichnet) verwendet (RAPER u. THOM 1949). — Die Anzüchtung des Pilzes zu den Versuchen geschah wie früher (HEINEN 1960) angegeben.

2. Herstellung der Enzymlösung

Die Vorextraktion des trocken gepreßten Mycels mit Wasser und die Hauptextraktion mit Phosphatpuffer wurde wie früher angegeben durchgeführt. Eine Vorreinigung der zum Rohextrakt "R" vereinigten beiden Extrakte erfolgte durch Zusatz von Protaminsulfat (2 mg pro ml Lösung) nach den Angaben von SCHLOSSMANN u. LYNEN (1957). Diese Enzymlösung wird mit "E" bezeichnet. Ammonsulfatfällungen wurden durch Zusatz festen Ammonsulfats zur Lösung R oder E unter gleichzeitigem Rühren bis zum Erreichen des gewünschten Sättigungsgrades hergestellt. Die ausgefällten Eiweiße wurden nach dem Abzentrifugieren in Phosphatpuffer pH 6,0, seltener in Wasser, suspendiert; nach 1-stündigem Stehen bei +5° wurden alle unlöslichen Eiweiße abzentrifugiert und die so entstandenen, mit "F" bezeichneten klaren Lösungen, zu den Versuchen verwendet.

3. Dialyse

Zur "Normal-Dialyse" wurden die Enzymlösungen in einen unten verschlossenen Cellophanschlauch von 2,2 cm \varnothing gefüllt und bei $+5^\circ$ verschieden lange gegen dest. Wasser dialysiert. Zur "Intensiv-Dialyse" (HEINEN 1958) wurde in die im Cellophanschlauch befindliche Lösung ein mit Wasser gefülltes verschlossenes Reagensglas bis zum Boden eingetaucht und wiederum gegen dest. Wasser bei $+5^\circ$ dialysiert. Auf diese Weise wird die Oberfläche des Dialysiergutes stark vergrößert, die Dialyse verläuft dadurch einerseits rascher, andererseits ist durch die kürzeren Dialysierzeiten eine mögliche Schädigung der Enzymeiweiße zu vermeiden.

4. Versuchsansätze

Zur Mehrzahl der Versuche wurden je 10 mg Cutin in 10 ml der zu prüfenden Enzymlösung (R, E oder F) suspendiert und 14 Std. bei 30° C in abgedeckten Bechergläsern oder verschlossenen Erlenmeyern inkubiert. Bei jeder Versuchsserie lief ein Kontrollansatz mit 10 mg Cutin in 10 ml Phosphatpuffer pH 6,0 mit. Veränderungen der Versuchsbedingungen hinsichtlich der Versuchszeit, der Temperatur, der Menge der Enzymlösung, oder andere Variationen sind jeweils im Text vermerkt.

5. Bestimmung der freigesetzten Cutin-Fettsäuren

a) Prinzip: Natives Cutin ist in heißem, konzentriertem Alkali unlöslich und kann nur durch Einwirkung von siedender, alkoholischer KOH oder durch Kochen am Rückflußkühler mit K_2CO_3 in Alkohol hydrolysiert und in Lösung gebracht werden. Hingegen reagieren die freien Fettsäuren aus Cutin direkt mit verdünnten Alkalien unter Bildung der entsprechenden Seifen. Sind durch die Wirkung von Enzymlösungen entsprechender Aktivität Fettsäuren aus dem Cutin abgespalten worden, so gehen diese im umgebenden wässrigen Milieu der Versuchsansätze nicht in Lösung. Überführt man derart vorbehandeltes Cutin in eine Alkalilösung bekannter Normalität, so wird bei der durch Erhitzen beschleunigten Seifenbildung eine bestimmte Menge der Lauge verbraucht, die der Menge freier Carboxylgruppen und somit der Menge Fettsäure äquivalent ist. Titriert man nun nach erfolgter Verseifung mit einer Säure gleicher Normalität, so wird umso weniger Säure verbraucht, je mehr Lauge bereits durch die Reaktion mit den Fettsäuren neutralisiert wurde. Zum Vergleich läuft jeweils einerseits der Kontrollansatz mit dem Cutin das in Pufferlösung angesetzt war, mit; andererseits ein Ansatz mit Lauge ohne Cutin, zur Kontrolle des Titors. Die Differenz zwischen dem Verbrauch an KOH durch das Cutin aus dem Kontrollansatz und dem aus der Enzymlösung ergibt die Menge der durch die Cutinase freigesetzten Fettsäuren.

b) Durchführung der Bestimmung: Das Cutin aus dem Kontrollansatz mit Pufferlösung und dem Versuchsansatz mit Enzymlösung wird aus der Lösung abfiltriert, gewaschen und getrocknet. Das Cutinpulver wird dann in trockene Reagensgläser überführt und das Gewicht bestimmt. Nach Zusatz von je 5,0 ml 0,01 n KOH werden die Gläser mit einer passenden hohlen Glaskugel lose verschlossen und in ein siedendes Wasserbad eingehängt. Nach 20 Min werden die Ansätze herausgenommen, abgekühlt und mit 0,01 n HCl unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator titriert. Der Verbrauch an HCl ergibt die durch die Verseifung neutralisierte Menge KOH, woraus die Menge der freigesetzten Fettsäure (ebenfalls in ml 0,01 n Lösung ausgedrückt) berechnet wird. Um bei Enzymlösungen mit unterschiedlichem Trockengewicht vergleichbare Werte zu erhalten, werden die Ergebnisse auf 1 mg Trockengewicht bezogen.

6. Präparate

Sowohl das zumeist verwendete Cutin von *Gasteria verrucosa*, als auch die Cutine von *Aloe arborescens*, *Prunus domestica*, *Pyrus communis*, *Vitis vinifera* und *Solanum lycopersicum* wurden nach der früher angegebenen Methode (ORGELL 1955, HEINEN 1960) hergestellt. Besonderheiten sind im Text angegeben.

III. ERGEBNISSE

1. *Nachweis der Cutinspaltung durch titrimetrische Bestimmung der Reaktionsprodukte*

Zur Orientierung über die zu erwartende Menge freier Fettsäuren die durch enzymatische Lyse des Cutins durch Einwirkung der Fermente aus *P. spinulosum* gebildet werden, wurden zunächst folgende Versuche angesetzt: Fein gemahltes Cutin wurde 15 Std bei 30° C mit a) einer Mycelsuspension von *P. spinulosum* in Phosphatpuffer pH 7,2 b) einem Wasserextrakt aus dem trocken gepreßten Pilzmycel c) einem Pufferextrakt d) einer 1:1-Kombination beider Extrakte und e) einem hitze-inaktivierten (5 Min, 95° C) Pufferextrakt als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde der Verbrauch des Cutins an 0,01 n KOH durch Rücktitration mit 0,01 n HCl, also die Menge der entstandenen freien Fettsäuren (ausgedrückt in ml 0,01 n Fettsäure, vgl. Methodik), bestimmt. Bei einer Substratkonzentration von je 20 mg Cutin pro Ansatz ergab sich, daß durch

a) Mycelsuspension:	$0,18 \times 10^{-3}$ ml	0,01 n Fettsäuren/10 mg Cutin/Tr. G.		
b) Wasserextrakt :	$1,72 \times 10^{-3}$ ml	"	"	"
c) Pufferextrakt :	$0,67 \times 10^{-3}$ ml	"	"	"
d) Kombination :	$1,82 \times 10^{-3}$ ml	"	"	"
e) Extrakt, inaktiv.:	$0,04 \times 10^{-4}$ ml	"	"	"

freigesetzt worden waren. Wenn es sich dabei auch absolut gesehen um sehr geringe Mengen handelt, so reichen diese doch aus, um die Bildung der freien Fettsäuren aus dem Substrat unter Einwirkung der Cutinase aus *P. spinulosum* zu verfolgen und relative Unterschiede durch Variation der Versuchsbedingungen bestimmen zu können. Obwohl die Aktivität des Pufferextraktes geringer scheint als die des Wasserextraktes, wurde doch aufgrund der früheren Befunde (HEINEN u. LINSKENS 1960, HEINEN 1960) zu den weiteren Untersuchungen ein Rohextrakt (R) verwendet, der durch Vorextraktion des Mycels mit Wasser und anschließender Extraktion mit Phosphatpuffer und Vereinigung beider Extrakte erhalten wurde.

a) *Versuche zur Ausschaltung störender Faktoren*

Die einleitenden Versuche zur Festlegung der günstigsten Versuchsbedingungen in Bezug auf die Art des Ansatzes, die Menge des zu verwendenden Extraktvolumens und die Versuchszeit, wurden mit dem Rohextrakt (R) aus *P. spinulosum* durchgeführt. Ansätze mit 20 ml Rohextrakt und 12 mg Cutin pro Ansatz wurden zur ersten Orientierung einerseits im Thermostaten bei 30° C, andererseits auf der Schüttelmaschine bei 27,5° C inkubiert. Die anschließende Titration der freigesetzten Fettsäuren nach 22 Std ergab, daß im geschüttelten Ansatz rund 75 % weniger an Reaktionsprodukten vorlag als in den nicht geschüttelten im Thermostaten bewahrten Proben, weshalb für die folgenden Versuche keine Schüttelansätze benutzt wurden.

Bei Versuchen mit einerseits unterschiedlichen Volumina Roh-

extrakt, andererseits verschieden langen Inkubationszeiten, ergab sich der unerwartete Befund, daß sowohl die Erhöhung der Enzymlösungsmenge als auch die Verlängerung der Inkubationszeit einen geringeren Anfall freigesetzter Fettsäure zur Folge hat (Tab. I). Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen interpretieren:

TABELLE I

Freisetzung von Fettsäuren aus Cutin durch Rohextrakt aus *P. spinulosum* bei Variation der Versuchszeit oder des Ansatzvolumens.

Versuchs- zeit	ml R pro Ansatz	ml 0,01 n frei- gesetzte Fettsäure
12 Stdn		$2,37 \times 10^{-3}$
24 „	12	$1,94 \times 10^{-3}$
48 „		$0,62 \times 10^{-3}$
	20,0	$0,90 \times 10^{-4}$
	15,0	$0,58 \times 10^{-3}$
24 Stdn	10,0	$1,14 \times 10^{-3}$
	5,0	$1,10 \times 10^{-3}$
	2,5	$0,13 \times 10^{-3}$

Im Extrakt befinden sich neben anderen auch die Enzyme des Fettsäureabbaus. Hierzu gehören die in Schimmelpilzen weit verbreiteten Enzyme der Methylyketonbildung (STÄRKLE 1924, STOKOE 1928, THALER u. GEIST 1939, THALER u. STÄHLIN 1949, FRANKE u. HEINEN 1958 a), wozu die in *Penicillium*- (KARRER u. HAAB 1948) und *Aspergillus*-Arten (FRANKE, HEINEN u. PLATZECK 1959) nachgewiesene β -Ketosauren-decarboxylase zählt. Vorhanden sind außerdem Fettsäure-Dehydrasen (MUKHERJEE 1951, 1952, FRANKE u. HEINEN 1958 b, HEINEN u. LINSKENS 1960, HEINEN 1960), die im Gegensatz zu pflanzlichen Fettsäure-Dehydrasen (vgl. Übersicht bei FRANKE u. FREHSE 1957) CoA-abhängig sind und durch Dialyse inaktiviert werden, so wie die übrigen, nach der Fettsäureabbaupirale von LYNEN (1955) am Fettsäurestoffwechsel beteiligten Enzyme. Durch das Zusammenwirken dieser Fermente werden die durch die Cutinase freigesetzten Fettsäuren weiter umgesetzt und somit dem hier angewandten Titrationsnachweis entzogen. Die Bestätigung für die Richtigkeit dieser Annahme ergab sich aus Versuchen zum Verhalten der Extrakte gegenüber Dialyse. Vorversuche zeigten bereits, daß durch Normaldialyse eine scheinbare Steigerung der Cutinase-Aktivität eintrat. Zur genaueren Verfolgung der Dialyse-Wirkung wurde der Rohextrakt einer "Intensivdialyse" bei $+5^\circ$ C gegen dest. Wasser unterzogen und die Aktivität der Lösung nach 4, 6, 14 und 24 Stdn geprüft. Wie Fig. 1 zeigt, lassen sich mit steigender Dialysierzeit bis zu einem Optimum nach etwa 10 Std. stets mehr freigesetzte Fettsäuren nachweisen. Die scheinbare Steigerung der Cutinase-Aktivität beruht dabei de facto auf einer fortschreitenden Inaktivierung der Begleitfermente, deren Ausfall zu einer Anhäufung der Cutin-Spaltprodukte führt, die einem weiteren Umsatz nicht mehr ausgesetzt sind. Der höhere Gehalt des Pufferextraktes an Abbau-Enzymen

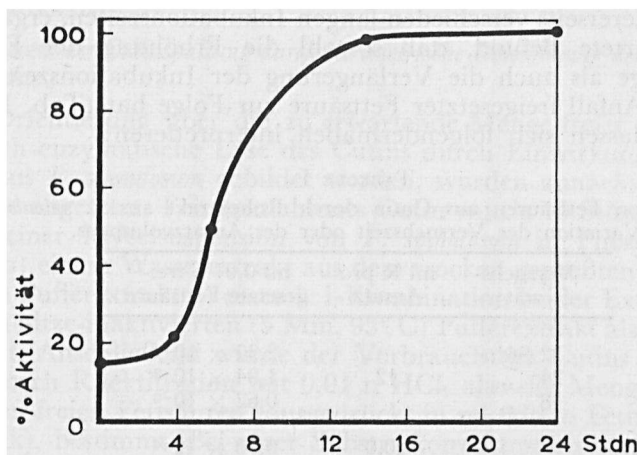


Fig. 1. Aktivität der Cutinase (ausgedrückt in %-Aktivität, wobei der Höchstwert von $2,45 \times 10^{-3}$ ml 0,01 m Fettsäure = 100 gesetzt ist) nach verschieden langer Intensivdialyse bei $+5^\circ$ gegen dest. Wasser. Titration der aus Cutin gelösten Fettsäuren nach 12-stündiger Inkubation.

erklärt auch die im Widerspruch zu früheren Ergebnissen (HEINEN 1960) stehende geringere Cutinase-Aktivität gegenüber dem Wasserextrakt: Nach 8-stündiger Intensivdialyse steigt die Aktivität bereits auf den 3-fachen Wert, die Aktivität des Wasserextraktes nimmt in der gleichen Zeit nur um $1/6$ des Ausgangswertes zu.

Die Verminderung der nachweisbaren Fettsäuremenge bei Erhöhung des Extraktvolumens pro Ansatz läßt sich auf die gleiche Weise erklären: Zugleich mit der Cutinase-Konzentration nimmt auch die Konzentration der Abbau-Enzyme zu, wobei das Gleichgewicht mit der Volumenzunahme derart verschoben wird, daß ein stets intensiverer Umsatz der freiwerdenden Fettsäure einsetzt, da die Konzentration bestimmter Abbau-Enzyme, wie beispielsweise der Dehydrase im Mycel recht gering ist (FRANKE u. HEINEN 1958 b), so daß diese erst von einem bestimmten optimalen Volumen an ihre volle Wirkung entfalten.

b) Protaminsulfat- und Ammoniumsulfat-Fällungen aus Rohextrakten

Aufgrund der Ergebnisse der Dialyseversuche schien es angebracht, im Folgenden zunächst zu versuchen, die Rohextrakte von störenden Begleitfermenten zu säubern, was natürlich durch Dialysieren erreicht werden kann, besser jedoch mittels Trennung der aktiven und inaktiven Eiweiße durch Fällungsmethoden. Nachdem bereits früher festgestellt worden war, daß sich die Cutinase mit Ammoniumsulfat ausfällen läßt (HEINEN 1960), ergaben weitere Versuche dieser Art, daß das gesamte in Bezug auf die Cutinspaltung aktive Eiweiß bei 60–70 %iger Sättigung der Rohextrakte mit Ammoniumsulfat ausgefällt werden kann (Tab. II); bei niedrigeren Sättigungsgraden ist die

TABELLE II

Aktivität der Cutinase nach Ausfällung bei verschiedenen Ammonsulfatsättigungsgraden aus Rohlösung: Fettsäurebildung aus Cutin durch 24-stündige Inkubation mit den Lösungen der einzelnen Fällungen.

Ammonsulfat-Konzentration	Trockengewicht in mg/ml ¹⁾	ml 0,01 n Fettsäure
0 % = Rohlösg.	9,33	$0,98 \times 10^{-3}$
50 %	6,97	$0,91 \times 10^{-3}$
60 %	7,44	$1,21 \times 10^{-3}$
70 %	7,72	$1,23 \times 10^{-3}$
85 %	9,15	$1,04 \times 10^{-3}$

¹⁾ Alle Ansätze mit 12,0 ml Lösung.

Ausfällung offenbar nicht vollständig, bei Konzentrationen über 70 % fallen dagegen weitere inaktive Eiweiße aus. Aktivitätssteigerung konnte auf diese Weise jedoch nicht erzielt werden, was z.T. darauf zurückzuführen ist, daß der Eiweißgehalt und somit das Trockengewicht der Lösung der Ammonsulfatfällung (= F) im Vergleich zur Ausgangslösung nur wenig vermindert ist. Bessere Ergebnisse brachte hingegen die Behandlung der Rohlösung mit Protaminsulfat (2 mg/ml Lösung) zur Entfernung der Nucleinsäuren nach SCHLOSSMANN u. LYNEN (1957): Die Aktivität der nucleinsäure-freien Enzymlösung (E) liegt etwa 3–4 mal höher als in der Ausgangslösung (vgl. Fig. 2).

Als brauchbare Methode ergab sich schließlich die Kombination beider Verfahren, nämlich eine Vorreinigung des Rohextraktes durch Fällung der Nucleinsäuren mit Protaminsulfat und anschließende

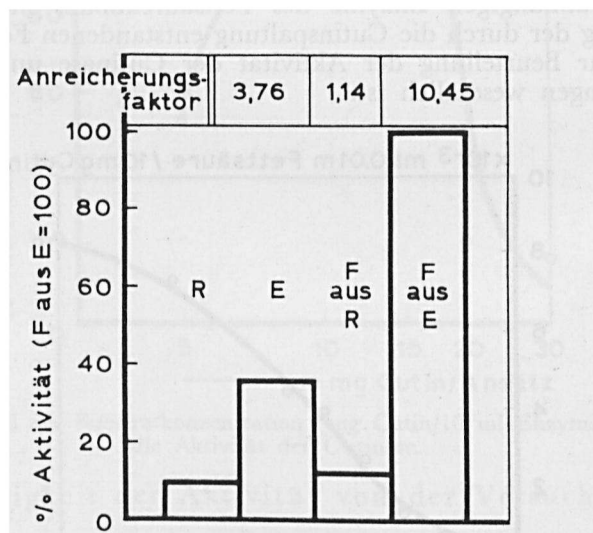


Fig. 2. Anreicherung der Cutinase durch Fällung bei 70 %iger Ammonsulfatkonzentration aus Rohextrakt (R) und aus durch Protaminsulfatbehandlung vorgereinigtem Extrakt (E).

Bestimmung der Cutin-Lyse nach 10-stündiger Inkubation der einzelnen Enzymlösungen bei 30° C mit je 10 mg Cutin pro Ansatz.

Fällung bei 70 %iger Sättigung der Lösung E mit Ammonsulfat und Aufnehmen der Fällung in Phosphatpuffer von pH 6,0, wobei nach Abzentrifugieren der unlöslichen Eiweiße eine klare Lösung (F) entsteht (Fig. 2). Interessant war die Beobachtung, daß eine fast gleich starke Anreicherung auch erzielt wird, wenn statt der Protaminsulfatfällung eine 10-stündige Normaldialyse (oder 6-stündige Intensivdialyse) der Ammonsulfatfällung vorausgeht (Tab. III). Zu den

TABELLE III

Fällung der Cutinase bei 70 %iger Ammonsulfatsättigung aus nicht dialysiertem und dialysiertem Rohextrakt. Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren nach 10-stündiger Inkubation mit je 10 ml Enzymlösung.

Enzymlösung	ml 0,01 n freigesetzte Fettsäure	Anreicherung
R	$0,35 \times 10^{-3}$	—
R, 10 h dialys. . .	$1,18 \times 10^{-3}$	3,38 - fach
F (70 %) aus R . .	$0,44 \times 10^{-3}$	1,26 - fach
F aus R (dialys) .	$3,42 \times 10^{-3}$	9,79 - fach

weiteren Versuchen wurden, wenn nicht anders angegeben, stets Enzymlösungen benutzt, die auf die oben angegebene Weise durch Extraktion, Vorreinigung der Rohlösung mit Protaminsulfat und anschließende Fällung bei 70 %iger Ammonsulfatsättigung erhalten worden waren. Zwar wird dabei eine nur etwa 10-fache Anreicherung des Enzyms erzielt, doch enthalten die Lösungen keine aktiven cofaktor-abhängigen Enzyme des Fettsäureabbaus mehr, was zur Erfassung der durch die Cutinspaltung entstandenen Fettsäuren und somit zur Beurteilung der Aktivität der Cutinase unter variierten Bedingungen wesentlich ist.

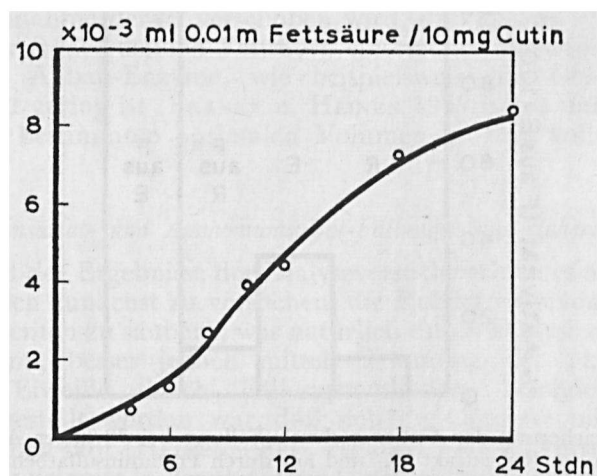


Fig. 3. Abhängigkeit der Cutinolyse von der Einwirkungszeit der Cutinaselösung, ausgedrückt in ml gebildeter Fettsäure (0,01 m).

2. Zur Kinetik der Cutinase aus *P. spinulosum*

a) Zur Beziehung zwischen Versuchszeit und der Cutinspaltung

Die Menge an freigesetzten Fettsäuren, die durch Einwirkung der Enzymlösung "F" auf *Gasteria*-Cutin entsteht, wurde mehrfach nach verschiedenen langer Einwirkungsdauer bestimmt. Die Auswertung dieser Versuchsreihen ergab, daß die Spaltung des Cutins innerhalb der ersten sechs Stunden langsam einsetzt, zwischen sechs und vierzehn Stunden stärker wird und danach, wahrscheinlich infolge einer Hemmung des Enzyms durch die Anhäufung von Reaktionsprodukten, langsam an Intensität verliert (Fig. 3). Bei allen weiteren Versuchen wurde deshalb mit konstanter Versuchszeit gearbeitet, oder die veränderte Versuchsdauer entsprechend berücksichtigt.

b) Substratkonzentration

Der Einfluß der Substratkonzentration auf die enzymatische Cutinspaltung wurde durch Inkubation steigender Mengen fein gemahlene Cutins mit konstantem Volumen (10 ml) Enzymlösung untersucht. Es ergab sich, daß optimale Cutinolyse in Anwesenheit von 1,0–1,5 mg Substrat pro ml Enzymlösung erfolgt (Fig. 4). Die graphische Ermittlung der Michaelis-Konstanten unter Zugrundelegung eines Molekulargewichtes von 300 betrug $1,7 \times 10^{-3}$ m.

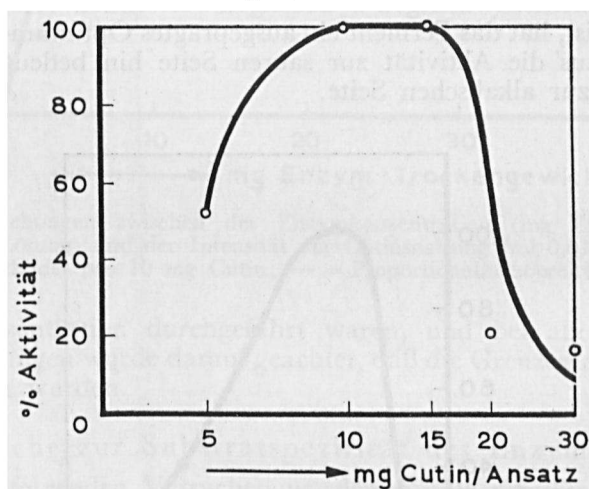


Fig. 4. Einfluß der Substratkonzentration (mg Cutin/10 ml Enzymlösung) auf die Aktivität der Cutinase.

c) Abhängigkeit der Aktivität von der Versuchstemperatur

Unter Beachtung der optimalen Substratkonzentration und Einwirkungszeit wurden Ansätze mit konstantem Volumen an Enzymlösung bei 2, 8, 15, 22, 30, und 40° inkubiert. Die Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren nach Versuchsende ergab, daß die Cutin-

spaltung in einem Bereich von 15–35° C unabhängig von der Temperaturerhöhung verläuft (Tab. IV). Unterhalb 15° C sinkt die Aktivität allerdings sehr rasch ab, der Aktivitätsverlust oberhalb des Optimalbereiches ist auf eine beginnende Schädigung (vgl. Temperaturstabilität!) des Proteins zurückzuführen.

TABELLE IV

Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Cutinspaltung durch eine Enzymlösung aus *P. spinulosum*.

Versuchstemperatur	2	8	15	22	30	40	°C
ml Fettsäure aus 10 mg Gasteriacutin.	2,75	7,60	11,90	12,55	12,60	11,21	$\times 10^{-3}$

d) pH-Aktivität der Cutinase

Die pH-Aktivität des Enzyms wurde für den Bereich von pH 4 bis pH 9,5 dadurch ermittelt, daß Ansätze unter sonst konstanten Bedingungen unter Variation des pH-Wertes durch die Verwendung entsprechender Puffer inkubiert wurden. Um pH-Verschiebungen durch den Puffer der Enzymlösung zu vermeiden, wurden die mit Ammonsulfat ausgefällten Eiweiße in Wasser suspendiert und die daraus erhaltenen wässrigen F-Lösungen verwendet. Wie aus Fig. 5 zu erschen ist, hat das Ferment ein ausgeprägtes Optimum bei pH 6,0 von dem aus die Aktivität zur sauren Seite hin bedeutend steiler abfällt als zur alkalischen Seite.

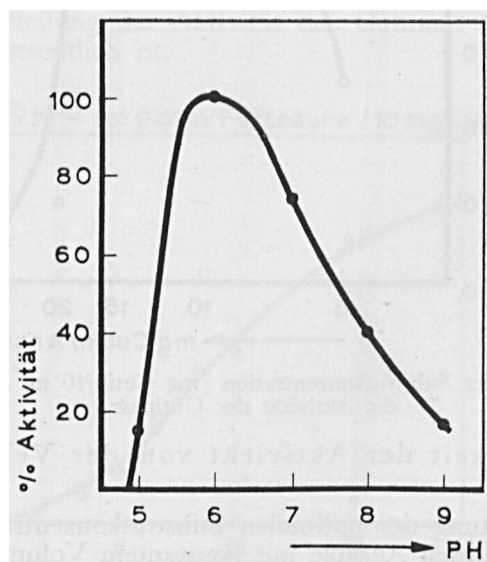


Fig. 5. Aktivität des cutinspaltenden Enzyms aus *P. spinulosum*-Extrakt in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationsansatzes.

e) Enzymkonzentration

Die Bestimmung der Cutinspaltung in Ansätzen mit steigendem Gehalt an Enzym ergab, wie Fig. 6 zeigt, einen Bereich der Proportionalität zwischen der Enzymkonzentration und der katalysierten Reaktion der nach unten hin mit 7,5 mg Enzymtrockengewicht, nach oben durch den Wert 22,5 mg Enzymtrockengewicht pro Ansatz begrenzt wird. Hieraus ließ sich ermitteln, daß alle bisherigen Versuche mit der angereicherten Lösung F im Bereich der optimalen

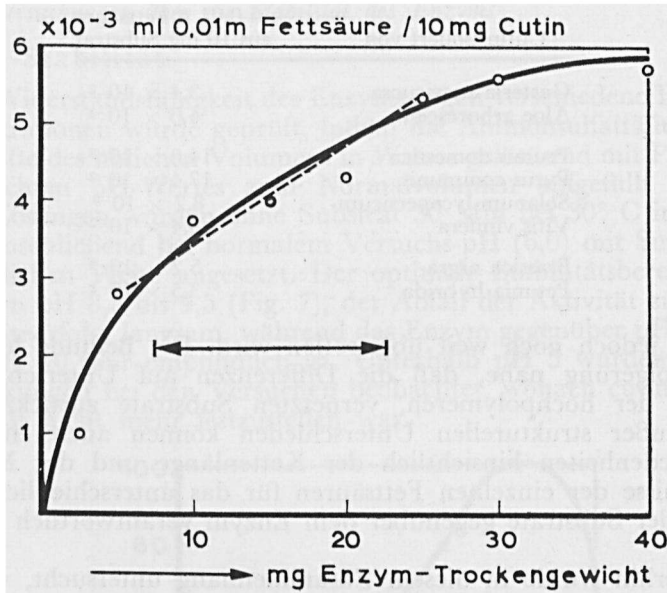


Fig. 6. Beziehungen zwischen der Enzymkonzentration (mg Enzymtrockengewicht/ml Lösung) und der Intensität der Cutinspaltung (ml 0,01 m Fettsäure gebildet pro 10 mg Cutin; \leftrightarrow = Proportionalitätsbereich).

Enzymkonzentration durchgeführt waren, und bei allen weiteren Untersuchungen wurde darauf geachtet, daß die Grenzen des Bereichs eingehalten wurden.

3. Versuche zur Substratspezifität des Enzyms

Zu den folgenden Versuchen wurden Cutine verschiedener Herkunft benutzt, die jedoch alle nach der früher angegebenen Methode isoliert wurden. Verwendet wurden zwei Blatt-Cutine, nämlich einerseits Cutin von den Blättern der *Gasteria verrucosa*, mit dem alle bisherigen Versuche durchgeführt wurden und andererseits Cutin von *Aloe arborescens*. Daneben wurden vier Frucht-Cutine isoliert und zwar von *Prunus domestica*, *Pyrus communis*, *Solanum lycopersicum* und *Vitis vinifera*. Außerdem wurden Griffel-, bzw. Narben-Cutine von *Petunia hybrida* und *Brassica nigra* als Substrate verwendet. Bei *Petunia* wurde etwa 1/5 des oberen Stempelteils abgeschnitten, bei *Brassica* die Narbe

vom Griffel getrennt und der Pectinaseeinwirkung ausgesetzt, worauf eine Nachbehandlung mit 96 %igem Alkohol folgte.

Die Verwendung der verschiedenen Cutine als Substrat ergab, daß die beiden Blatt-Cutine mit etwa gleicher Intensität angegriffen werden (Tab. V). Hingegen ist bei den Cutinen der Fruchtschalen eine höhere Abbau-Aktivität gegeben, die von den beiden Stempel-

TABELLE V

Lyse von Cutin verschiedener Herkunft durch *Penicillium spinulosum* Extrakt.

Cutin isoliert von	ml 0,01 n Fettsäure aus 10 mg Substrat
<i>Gasteria verrucosa</i>	$3,4 \times 10^{-3}$
<i>Aloe arborescens</i>	$4,0 \times 10^{-3}$
<i>Prunus domestica</i>	$14,0 \times 10^{-3}$
<i>Pyrus communis</i>	$17,4 \times 10^{-3}$
<i>Solanum lycopersicum</i> . .	$8,2 \times 10^{-3}$
<i>Vitis vinifera</i>	$8,4 \times 10^{-3}$
<i>Brassica nigra</i>	$5,2 \times 10^{-2}$
<i>Petunia hybrida</i>	$3,5 \times 10^{-2}$

cutinen jedoch noch weit übertroffen wird. Die Befunde legen die Schlußfolgerung nahe, daß die Differenzen auf Unterschiede im Aufbau der hochpolymeren, vernetzten Substrate zurückzuführen sind. Außer strukturellen Unterschieden können auch chemische Verschiedenheiten hinsichtlich der Kettenlänge und der Mengenverhältnisse der einzelnen Fettsäuren für das unterschiedliche Verhalten der Substrate gegenüber dem Enzym verantwortlich sein.

Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang untersucht, wie sich der Zustand des Substrates auf die Enzymaktivität auswirkt. Dazu wurde einerseits frisches *Gasteria*-Cutin als Substrat verwendet, andererseits wurde aber auch das Cutin aus den Versuchsansätzen wieder

TABELLE VI

Aktivität einer Enzymlösung aus *P. spinulosum* gegenüber Cutin, das mehrfach als Substrat verwendet wurde (vgl. Text).

Substrat-Alter	Enzym-Aktivität
<i>Gasteria</i> -Cutin, frisch isoliert.	74,35 %
Cutin, 2. Verwendung als Substrat	100,00 %
Cutin, 3. Verwendung als Substrat	53,82 %
Unverseifbarer Rest nach Alkalihydrolyse . .	0,02 %

isoliert, z.T. ein zweites Mal benutzt und wieder isoliert. So standen neben dem Frischmaterial zwei ältere Substrate zur Verfügung, die zum 2. resp. 3. Mal der Enzymwirkung ausgesetzt werden konnten. Außerdem wurde noch der bei der Hydrolyse von *Gasteria*-Cutin mit alkoholischer KOH verbleibende "unverseifbare Rest" als Substrat angeboten. Wie Tab. VI zeigt, ist die Fettsäurebildung bei dem

Cutin, das bereits einmal als Substrat gedient hat, stärker als beim Frischmaterial. Das kann u.U. dahingehend erklärt werden, daß durch die Ersteinwirkung durch Herauslösen eines Teils der Fettsäuren eine vergrößerte Oberfläche entstanden ist, die dem Enzym dann eine bessere Angriffsfläche bietet. Der rasche Abfall der Aktivität bei weiterer Verwendung steht wohl damit im Zusammenhang, daß das angreifbare Material stark vermindert ist. Aus dem "Unverseifbaren" werden praktisch keine Fettsäuren freigesetzt.

4. Untersuchungen über die Stabilität des Enzyms

a) pH-Stabilität

Die Widerstandsfähigkeit des Enzyms gegen verschiedene H-Ionenkonzentrationen wurde geprüft, indem die Ammonsulfatfällungen in der Hälfte des üblichen Volumens in Wasser gelöst und mit Puffer des gewünschten pH-Wertes zum Normalvolumen aufgefüllt wurden. Diese Lösungen wurden ohne Substrat 30 Min bei 30° C inkubiert, dann anschließend bei normalem Versuchs-pH (6,0) mit Substrat in der üblichen Weise angesetzt. Der optimale Stabilitätsbereich liegt zwischen pH 8,5 bis 9,5 (Fig. 7), der Abfall der Aktivität zur linken Seite hin erfolgt langsam, während das Enzym gegenüber pH-Werten oberhalb 10 sehr empfindlich ist. Unterhalb pH 5 wurden Eiweißausflockungen bei den Versuchen beobachtet, wonach cutinolytische Aktivität nicht mehr festzustellen war.

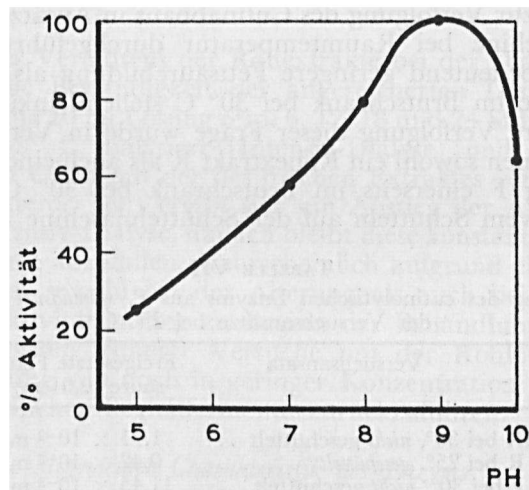


Fig. 7. pH-Einfluß auf die Stabilität des cutinspaltenden Enzyms aus *P. spinulosum* nach halbstündiger Inkubation bei bestimmten pH-Werten und anschließendem Ansatz mit Substrat bei pH 6,0.

b) Temperatur-Stabilität

Sie wurde durch 30 Min langes Erwärmen der Enzymlösung (je 2×10 ml) auf resp. 20, 30, 40, 45, 50, 55 und 60° C ermittelt. Die Lösungen wurden dann mit Substrat bei der normalen Versuchs-

temperatur angesetzt und schließlich die Aktivität der einzelnen Proben bestimmt. Die graphische Ermittlung der "Tötungstemperatur" (Fig. 8) nach der Definition von v. EULER (1925) ergab einen Wert von 57° C.

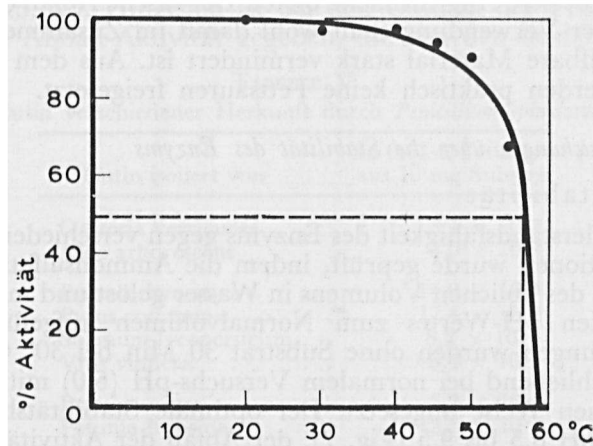


Fig. 8. Thermolabilität der Cutinase: Cutinspaltung nach halbstündiger Einwirkung von Temperaturen von 0–50° C auf eine Enzymlösung aus *P. spinulosum*.

c) Schüttelversuche (mechanische Stabilität)

Versuche zur Verfolgung des Cutinabbaus in Ansätzen, die auf der Schüttelmaschine bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, ergaben eine bedeutend geringere Fettsäurebildung als in denjenigen Ansätzen, die im Brutschrank bei 30° C stehend inkubiert wurden. Eine genauere Verfolgung dieser Frage wurde in Versuchen durchgeführt in denen sowohl ein Rohextrakt R als auch eine angereicherte Enzymlösung F einerseits im Brutschrank bei 30° C, andererseits unter intensivem Schütteln auf der Schüttelmaschine inkubiert wur-

TABELLE VII

Teilinaktivierung des cutinolytischen Enzyms aus *P. spinulosum* durch Schütteln der Versuchsansätze bei 25° C.

Versuchsansatz	Freigesetzte Fettsäure (0,01 m)
R bei 30°, nicht geschüttelt .	$1,71 \times 10^{-3}$ ml
R bei 25°, geschüttelt	$0,42 \times 10^{-3}$ ml
F bei 30°, nicht geschüttelt .	$11,45 \times 10^{-3}$ ml
F bei 25°, geschüttelt	$3,96 \times 10^{-3}$ ml

den. Wie aus den Werten der Tab. VII zu ersehen ist, liegt die Aktivität des Enzyms bei beiden Extrakten durch das Schütteln wesentlich niedriger im Vergleich zu den anderen Ansätzen. Daraus kann auf eine "Schüttel-Inaktivierung" wie sie ähnlich auch bei anderen Enzymen, z.B. der Lipoxydase (FRANKE u. FREHSE 1953), schon beobachtet wurde, geschlossen werden.

d) Alterungs- und Dialyse-Versuche

Im Laufe der Versuche hatte sich die Cutinase bereits als ein recht stabiles Ferment erwiesen. Zur Feststellung, ob das Alter der Extrakte einen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms hat, wurden angereicherte F-Lösungen über längere Zeit (2, 5, und 10 Tage) im Kühlraum bei $+5^{\circ}\text{C}$ stehen gelassen und danach zu Ansätzen mit Substrat unter den üblichen Bedingungen verwendet. Die Angaben der Tab. VIII (oberer Teil) zeigen, daß nach 48-stündiger Alterung ein geringer Anstieg der Aktivität zu verzeichnen ist, daß die Aktivität dann über 3 weitere Tage konstant bleibt und nach 10 Tagen erst etwas abgesunken ist.

TABELLE VIII

Einfluß der Alterung und der Dialyse (Intensiv-Dialyse) auf die Enzym-Aktivität.

Enzymlösung	Titrationwert nach Verseifung
frisch.	$9,4 \times 10^{-3} \text{ ml}$
2 Tage bei $+5^{\circ}$	$10,3 \times 10^{-3} \text{ ml}$
5 Tage bei $+5^{\circ}$	$10,1 \times 10^{-3} \text{ ml}$
10 Tage bei $+5^{\circ}$	$9,7 \times 10^{-3} \text{ ml}$
frisch.	$9,1 \times 10^{-3} \text{ ml}$
6 Std.)	$12,8 \times 10^{-3} \text{ ml}$
12 Std.) Intensiv-	$12,5 \times 10^{-3} \text{ ml}$
18 Std.) dialyse	$12,7 \times 10^{-3} \text{ ml}$
24 Std.)	$11,2 \times 10^{-3} \text{ ml}$

Aufgrund des Verhaltens der Rohextrakte bei der Dialyse (Fig. 1) wurde auch die Beständigkeit der angereicherten Lösung geprüft. Hierzu wurden je 10 ml Lösung resp. 6, 12, 18 und 24 Std. gegen dest. Wasser bei $+5^{\circ}\text{C}$ dialysiert (Intensiv-Dialyse) und danach ihre Aktivität gegen Cutin mit der des frischen Extraktes verglichen. Aus Tab. VIII (unterer Teil) ergibt sich ein Anstieg der Aktivität nach 6-stündiger Intensiv-Dialyse, danach bleibt diese konstant und beginnt erst nach 24 Std. abzufallen, wahrscheinlich aufgrund einer Proteinschädigung. Der sowohl bei der Alterung als auch bei der Dialyse beobachtete Aktivitätsanstieg zu Beginn der Behandlung ist, analog zu den Ergebnissen früherer Versuche mit der Rohlösung R, auf eine Inaktivierung von noch in geringer Konzentration vorhandener dialyse-empfindlicher Begleitfermente zurückzuführen.

5. Versuche zur allgemeinen Charakteristik des Enzyms

a) Aktivitätsprüfungen unter verschiedener Gasatmosphäre

Die Frage, ob die Aktivität des Enzyms durch bestimmte Gase beeinflusst werden könnte, wurde in Versuchen geprüft, bei denen ein langsam perlender Gasstrom durch die Ansätze geleitet wurde. Luft wurde durch eine kleine Pumpe über ein Wattefilter in die Lösung geleitet, die anderen Gase, nämlich Sauerstoff, Stickstoff und Kohlen-

säure wurden aus Druckflaschen ebenfalls über Wattefilter eingeleitet. Die Versuche ergaben (Tab. IX) einen Anstieg der Aktivität gegenüber dem Normalversuch bei Einleitung von Sauerstoff oder Luft. Aber auch bei Verwendung von CO_2 oder N_2 lagen die Werte etwas höher als bei dem Vergleichsansatz. Daraus ergibt sich, daß das Enzym unter allen gebotenen Atmosphären aktiv ist. Die bei der Durchlüftung beobachtete Aktivierung ist wahrscheinlich nicht auf die Wirkung des einen oder anderen Gases zurückzuführen, sondern auf die bessere Verteilung des Substrates durch den durchperlenden Gasstrom.

TABELLE IX

Intensität der Cutinspaltung bei Begasung unter Sauerstoff-, Luft-, Kohlensäure- und Stickstoffatmosphäre im Vergleich zum normalen, nicht belüfteten Ansatz.

Versuchsansatz	Cutinase-Aktivität
normal bei 30° . .	81 %
belüftet mit O_2 . .	100 %
belüftet mit Luft . .	98 %
belüftet mit CO_2 . .	88 %
belüftet mit N_2 . .	84 %

b) Einige Bestimmungsversuche zum Enzymtyp

Nachdem aus den Belüftungsversuchen bereits deutlich geworden war, daß die Cutinase kein O_2 -abhängiges Enzym ist, wurden in weiteren Versuchen verschiedene andere Enzyme im Extrakt bestimmt und ihr Verhalten bei der Anreicherung verfolgt. Dabei ergab sich, daß die Konzentration der im Rohextrakt nachweisbaren *Katalase* (GAGNON, HUNTING u. ESSELEN 1959), *Esterase* (STANSLEY u. RAMSEY 1956, MUFTIC 1954, BARNETT u. SELIGMAN 1951) und *Pectinase* (ORSELL 1955) im angereicherten Extrakt F bedeutend geringer ist. Demnach ist die Cutinase mit keinem dieser Enzyme identisch. Angaben über den Wirkungsmechanismus des Enzyms sind aufgrund der bisherigen Ergebnisse nicht möglich.

c) Zur Lokalisation des Enzyms

Zur Prüfung der Frage, ob das im Mycelextrakt nachgewiesene cutinspaltende Enzym in den Mitochondrien oder im Cytoplasma der Zellen lokalisiert ist, wurde ein wie üblich gewonnener Rohextrakt R in der Kühlzentrifuge 25 min lang bei -3° und 22.000 g zentrifugiert. Die Mitochondrien, die sich bei dieser Behandlung als brauner Niederschlag abscheiden, wurden in Phosphatpuffer pH 6,0 aufgenommen und zwar im halben Volumen der Ausgangslösung. Der mitochondrien-freie Überstand wurde dann wie üblich mit Protaminsulfat und Ammonsulfat gefällt und die erhaltene Enzymlösung F' mit einer normalen Lösung F aus mitochondrienhaltigem Rohextrakt verglichen. Die Aktivitätsprüfung der drei Lösungen F, F' und M (= Mitochondriensuspension) ergab, daß die Mitochondrien keinerlei Aktivität enthalten, und daß durch vorheriges Auszentrifugieren der

Partikel die Aktivität der Enzymlösung F' gegenüber F gesteigert werden kann (Tab. X).

TABELLE X.
Bestimmung der Lokalisation der Cutinase (vgl. Text).

Enzymlösung	ml 0,01 n freigesetzte Fettsäure
F aus mitochondrienhaltiger Lösung .	$7,1 \times 10^{-3}$
F' aus mitochondrienfreier Lösung . .	$11,5 \times 10^{-3}$
Mitochondrien-Suspension "M" . . .	0

IV. ZUSAMMENFASSUNG

1) Das cutinspaltende Enzym in Extrakten aus *Penicillium spinulosum* läßt sich durch Vorreinigung mit Protaminsulfat und Ammonsulfatfällung bei 70 %iger Sättigung etwa 10-fach anreichern. Dabei können zugleich störende Begleitfermente abgetrennt werden.

2) Die Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen ergaben: Für die Substratkonzentration einen Bereich von 1,0–1,5 mg Cutin pro ml Enzymlösung, Unabhängigkeit der Reaktion von der Temperatur in einem Bereich von 15–35° C, optimales pH von 6,0 sowie einen Proportionalitätsbereich für die Enzymkonzentration von 7,5–22,5 mg Enzymtrockengewicht pro Ansatz.

3) Die Prüfung der Substratspezifität zeigte, daß außer dem Cutin von Blättern auch das von Früchten und Stempeln angegriffen wird.

4) Die Stabilität des Enzyms gegenüber der H-Ionenkonzentration, der Temperatur, Alterung und Dialyse wurde geprüft, wobei sich das Ferment als recht beständig und unabhängig von dialysablen Co-Faktoren erwies.

5) Weitere Versuche dienten zur allgemeinen Charakterisierung des Enzyms, dessen Wirkungsweise bisher nicht geklärt werden konnte. Die Cutinase ist kein Mitochondrienenzym, sondern im Cytoplasma der Zellen lokalisiert.

SUMMARY

1) A cutinolytic enzyme present in extracts of *P. spinulosum* was enriched by purification of the extract with protamine sulfate followed by treatment with ammonium sulfate at 70 % salt concentration. A separation from disturbing enzymes is obtained this way.

2) Determination of the optimum reaction conditions gave these results: Optimum of substrate concentration 1,0–1,5 mg cutin/ml enzyme solution, independence of the reaction from temperature between 15–35° C, pH-optimum at pH 6,0 and proportionality between concentration of enzyme and destruction of substrate from 7,5 to 22,5 mg dry weight per ml sample.

3) Examination of substrate specificity with different cutins from leaves, fruits and stamps showed, that cutin isolated of stamps is much better attacked than all other materials tested.

4) The stability of the enzyme against H-ion concentration, temperature, aging and dialysis has been tested. According to the results obtained, cutinase is a stable enzyme needing no dialysable co-factors. Evidence has been made, that cutinase is inactivated by shaking.

5) Further examinations were done for general characterisation of the enzyme but failed in getting a definition about the enzymes' mechanism of action. Cutinase is not localized in the mitochondrial fraction but in the cytoplasm of the cell.

ACKNOWLEDGEMENTS

Herrn Professor Dr. H. F. Linskens danke ich für die Förderung meiner Arbeit. Ich danke der Niederländischen Organisation für Reinwissenschaftliche Forschung (Z.W.O.) für Unterstützung.

LITERATUR

- BANCHER, E., J. HÖLZL u. J. KLIMA. 1960. *Protoplasma* **52**: 247.
 BARNETT, R. J. and A. M. SELIGMAN. 1951. *Science* **114**: 579.
 BOLLIGER, R. 1959. *J. Ultrastructure Res.* **3**: 105.
 CHRIST, B. 1959. *Z. Bot.* **47**: 88.
 EULER, H. v. 1925. *Chemie der Enzyme I*, München: 272.
 FARKASDI, G. 1950. *Dtsch. Landwirtsch.* **9**: 69.
 FRANKE, W. u. H. FREHSE. 1953. *Hoppe-Seyler's Z.* **295**: 334.
 ——— u. ———. 1957. *Hb. Pflanzenphysiol. VII*, Berlin-Göttingen-Heidelberg: 137.
 ——— u. W. HEINEN. 1958a. *Arch. Mikrobiol.* **31**: 50.
 ——— u. ———. 1958b. *Arch. Mikrobiol.* **31**: 359.
 ———, ——— u. A. PLATZECK. 1959. *Fette, Seifen, Anstrichm., Ernährungsind.* **61**: 264.
 FREY-WYSSLING, A. 1953. *Submicroscopic Morphology of Protoplasma and its derivatives*, Amsterdam.
 FULTON, J. P. 1948. *Phytopathology* **38**: 235.
 GAGNON, M., W. M. HUNTING u. W. B. ESSELEN. 1959. *Analyt. Chem.* **31**: 144.
 GÄUMANN, E. 1951. *Pflanzliche Infektionslehre*, 2e Aufl., Basel.
 HEINEN, W. 1958. *Dissertation*, Köln.
 ———. 1960. *Acta Botan. Neerl.* **9**: 167.
 ——— u. H. F. LINSKENS. 1960. *Naturwissenschaften* **47**: 18.
 JUNIPER, B. E. 1959. *Endeavour* **18**: 20.
 ——— u. D. E. BRADLEY. 1958. *J. Ultrastructure Res.* **2**: 16.
 KARRER, P. u. F. HAAB. 1948. *Helv. chim. Acta* **31**: 795.
 KOLJO, B. 1957. in E. TREIBER, *Die Chemie der Pflanzenzellwand*, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
 LINSKENS, H. F. 1950. *Planta* **38**: 591.
 ———. 1952. *Planta* **41**: 40.
 LOPRIENO, L. u. J. TENERINI. 1959. *Phytopath. Z.* **34**: 385.
 LYNEN, F. 1955. *Angew. Chemie* **67**: 463.
 MATIC, M. 1956. *Biochem. J.* **63**: 168.
 MEYER, F. H. 1959. *Arch. Mikrobiol.* **33**: 149.
 MILLER, H. N. 1949. *Phytopathology* **39**: 403.
 MUFTIC, M. K. 1954. *Enzymologia* **17**: 123.
 MUKHERJEE, S. 1951. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**: 364.
 ———. 1952. *Arch. Biochem. Biophys.* **35**: 23.
 ORGELL, W. H. 1955. *Plant Physiol.* **30**: 78.
 PRIESTLEY, J. H. 1943. *Botan. Rev.* **9**: 539.
 RAPER, K. B. and C. THOM. 1949. *A Manual of the Penicillia*, Baltimore: 181.
 ROELOFSEN, P. A. 1952. *Acta Botan. Neerl.* **1**: 99.
 ———. 1959. *Hb. Pflanzenanatomie III.4. The Plant Cell-wall*, Berlin: 86-90.
 SCHLOSSMANN, K. u. F. LYNEN. 1957. *Biochem. Z.* **328**: 591.
 SCHWEIZER, H. 1958. *Phytopathol. Z.* **33**: 55.
 SIDDIQI, A. M. and A. L. TAPPEL. 1956. *Arch. Biochem. Biophys.* **60**: 91.
 SITTE, P. 1955. *Mikroskopie*, Wien **10**: 178.
 ———. 1957. in E. TREIBER, *Die Chemie der Pflanzenzellwand*, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
 STANSLY, P. G. and D. S. RAMSEY. 1956. *J. lab. clin. med.* **48**: 649.
 STÄRKLE, M. 1924. *Biochem. Z.* **151**: 374.
 STOKOE, W. N. 1928. *Biochem. J.* **22**: 80.

- TENERINI, J. u. N. LOPRIENO. 1960. *Phytopathol. Z.* **39**: 101.
THALER, H. u. G. GEIST. 1939. *Biochem. Z.* **302**: 121.
——— u. J. STÄHLIN. 1949. *Biochem. Z.* **320**: 84.
TREIBER, E. 1955. in *Hb. Pflanzenphysiol. I*, Berlin-Göttingen-Heidelberg: 688.
———. 1957. *Die Chemie der Pflanzenzellwand*, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
WIERINGA, K. T. 1955. *Z. Pflanzenernähr., Düngung u. Bodenk.* **69**: 150.
YARWOOD, C. E. 1957. *Bot. Rev.* **23**: 235.
ZETSCHKE, F. 1932. in *Hb. Pflanzenanalyse III.1*, Wien: 217.