

## 5. Über adaptive Enzyme bei parasitischen Pilzen I

von Ernst Gäumann und Erika Böhni.

(28. X. 46.)

Die Enzyme, die ein Organismus, insbesondere ein Mikroorganismus, produziert, lassen sich je nach den Voraussetzungen, unter denen er sie bildet, in konstitutive und in adaptive Enzyme einteilen (*Karström*, z. B. 1938).

Die konstitutiven Enzyme werden von dem betreffenden Organismus stets gebildet; ihre Bildung ist somit im Prinzip von der chemischen Zusammensetzung des Substrates unabhängig; so produzieren die Hefen stets Invertase, gleichgültig ob das Nährmedium Saccharose enthält oder nicht. Immerhin kann die Produktion derartiger Enzyme durch Stoffe, die mit dem Mechanismus der Enzymwirkung nichts zu tun haben, quantitativ erheblich gesteigert werden.

Die adaptiven Enzyme werden dagegen von dem betr. Organismus nur bei Bedarf in messbarer Weise gebildet; so beobachtete schon *Wortmann* (1882), dass ein nicht identifiziertes Bakterium Amylase erzeugte, wenn es auf einem stärkehaltigen Nährboden kultiviert wurde, wogegen dieses Enzym auf stärkefreien Substraten nicht in Erscheinung trat. Es geht somit in diesem Falle von dem betreffenden Nährstoff ein Reiz aus, und als Reizantwort stellt der Mikroorganismus seine Enzymproduktion quantitativ und (oder) qualitativ auf ihn um und bildet jenes Enzym neu oder in sehr erhöhtem Masse, welches eben diesen Nährstoff abbaut.

Der Mechanismus von Reiz und Reizantwort scheint bei den adaptiven Enzymen des Tier- und des Pflanzenreiches verschieden zu sein.

Im tierisch-menschlichen Körper wird die vermehrte Ausscheidung der Verdauungssäfte aus den in Frage kommenden Drüsen mittelbar ausgelöst, und zwar einerseits reflektorisch auf dem Wege über die betr. Ganglien und anderseits auf chemischem Wege, ohne direkte Vermittlung des Nervensystems, durch Sekretine (Rufstoffe) über die Blutbahn. Die Reflexbewegungen des Nervensystems lassen sich auch rein psychogen durch Sinneswahrnehmungen oder durch blosse Vorstellungen einleiten (Auslösung „bedingter“ Reflexe; *Pavlow*, 1926).

Im pflanzlichen Körper scheint dagegen die Bildung von adaptiven Enzymen vorwiegend durch unmittelbare Einwirkung

des spezifischen Nährstoffes auf die enzymproduzierenden Zellen oder Organe selbst veranlasst zu werden. *Yudkin* (1938) nimmt an, dass das homologe Substrat nicht die Bildung eines neuen Enzyms anzuregen vermag, sondern nur die erhöhte Bildung eines Enzyms veranlasst, das auch ohnehin in kleinsten Mengen gebildet worden wäre: das adaptive Enzym steht irgendwie in einem Gleichgewicht mit einer Vorstufe; wenn es sich mit dem spezifischen Nährstoff verbindet, so wird dieses Gleichgewicht gestört und die Vorstufe baut entsprechend mehr Enzym auf. Anderseits kann man sich die Wirkung des spezifischen Substrates auch durch die Annahme erklären, dass es notwendige Molekel für die Synthese des betr. Enzyms liefert, oder dass es mit ihm Bindungen eingeht, die seine Stabilität erhöhen.

### Über die Verbreitung der adaptiven Enzyme im Pflanzenreich wissen wir wenig.

Innerhalb der Blütenpflanzen spielen sich bei gewissen „fleischfressenden“ (insektivoren) Pflanzen komplizierte Vorgänge ab, die wahrscheinlich zur Bildung adaptiver Enzyme führen. Eiweissstückchen lösen auf *Drosera*-Blättern Reizbewegungen (die Tentakel biegen sich gegen den Fremdkörper hin) und eine intensive Sekretionstätigkeit aus; diese ist zwar im einzelnen noch nicht analysiert worden; die tiefgreifenden zytologischen Veränderungen in den peripheren Tentakelzellen (deren Plasma z. B. vorübergehend von basiphil zu eosinophil hinüberwechselt; *Huie*, 1897, 1899; *Lloyd*, 1942) zeigen immerhin, dass die betr. Zellen auf den Reiz der Beute mit einem anders gearteten Stoffwechsel antworten.

*Quintanilha* (1926) gibt in einer portugiesisch geschriebenen und uns deshalb nur in der Zusammenfassung zugänglichen Arbeit an, dass bei *Drosophyllum lusitanicum* die Exkretion der Verdauungssäfte erst durch spezifische Reize ausgelöst wird:

„Les deux types de glandes du *Drosophyllum* présentent des aptitudes et des fonctions tout-à-fait définies et différentes. Les pédiculées sont essentiellement des organes préhenseurs ou de capture et en même temps des signales d'alarme. Ce sont elles qui, au moyen de leur sécrétion particulière, visqueuse, attrapent les insectes, en les soutenant, en même temps qu'elles excitent les glandes sessiles en provoquant ainsi leur activité; ces dernières sont exclusivement des organes de digestion et d'absorption; il leur faut être excitées pour fonctionner en organes de sécrétion.“

Es scheint sich also hier wirklich um die Bildung adaptiver Verdauungs-Enzyme zu handeln.

Unter den Kryptogamen sind wir bei den Bakterien über die Fähigkeit zur Bildung adaptiver Enzyme verhältnismässig gut unterrichtet. *Dubos* (1940) hat die einschlägigen Fragen umfassend dargestellt.

Vollkommen ungenügend sind dagegen unsere Kenntnisse über die adaptiven Enzyme der parasitischen Pilze; und doch wäre

hier eine vertiefte Einsicht sehr von Nöten; denn es ist nicht ausgeschlossen, dass wir von dieser Grundlage aus dem Verständnis der scharfen biologischen Spezialisierung mancher parasitärer Pilze näherkommen können (*Gäumann*, 1946, S. 287 u. f.). Methodisch stehen zwar diesem Unterfangen grosse Schwierigkeiten entgegen: wir sind gezwungen, aus den Beobachtungen *in vitro* (in künstlichen Laboratoriumskulturen) auf die enzymatischen Fähigkeiten der betr. Erreger *in vivo* (im Innern des Wirtes) zu schliessen, eine Extrapolation, die grosse Fehlermöglichkeiten in sich schliesst. Wie weit entfaltet ein bestimmter Erreger seine vollen enzymatischen Fähigkeiten schon in den von uns gewählten künstlichen Nährmedien (konstitutive Enzyme), und wie weit erst im Innern des Wirtes, wenn sich im Kampf um den Wirt und mit dem Wirt der Bedarf hierfür einstellt (adaptive Enzyme)?

Die nachfolgenden Untersuchungen möchten hierzu einen ersten kleinen Beitrag leisten. Sie wurden teilweise mit Hilfe der Arbeitsbeschaffungskredite des Bundes durchgeführt, für deren Vermittlung wir den zuständigen Behörden unsern Dank wiederholen.

### 1. Kapitel. Material und Methoden.

Als Modellsubstanz wurde für die vorliegende Mitteilung das Pektin gewählt; denn es ist pflanzenpathologisch wichtig und der enzymatische Abbau verläuft bei ihm verhältnismässig rasch und lässt sich deshalb laboratoriumsmässig innert nützlicher Frist verfolgen; sodann standen uns in Herrnkollegen *H. Pallmann* und Dr. *H. Deuel* vom Agrikulturchemischen Institut der E.T.H. zwei Pektinspezialisten zur Seite, die uns unermüdlich mit Rat und Material aushalfen und dadurch entscheidend zum Gelingen unserer Untersuchungen beitrugen.

Als Substrat für die Enzymbestimmungen und als Zusatz bei den synthetischen Nährösungen fand immer das gleiche Pektin Verwendung. Dieses Pektin, das heute als eine zum Teil mit Methylalkohol veresterte Polygalakturonsäure aufzufassen ist, hatte ein Äquivalentgewicht von ungefähr 350 und wurde von der *Sugro A.G.* Basel als Pektin „Alex Grünband (320°)“ bezogen. Dank seiner freien und methoxylierten Carboxylgruppen liessen sich bequem wässrige Lösungen von verschiedenem Pektингehalt herstellen, wenn die Pektinmenge vor Zugabe des destillierten Wassers mit einigen cm<sup>3</sup> 50-proz. Alkohols gleichmässig befeuchtet wurde.

Unter den pektinabbauenden Enzymen beschränkten wir uns auf die Pektinase und die Pektase. Die Protopektinase, die das in kaltem Wasser unlösliche Protopektin (d. i. eine Pektin-Cellulose-Verbindung) der Mittellamellen in wasserlösliches Pektin überführt und den pflanzenpathogenen Mikroorganismen das inter-

celluläre Wachstum ermöglicht, wurde nicht berücksichtigt, weil für sie noch keine quantitative Testmethode besteht.

Die Pektinase greift die Kernsubstanz des Pektins, die partiell veresterte Polygalakturonsäure an, löst ihre glucosidischen Bindungen und zerlegt sie in Galakturonsäure, Galaktose, Arabinose usw. Ihre Wirkung entspricht einer Säurehydrolyse.

Die Pektase ist ein sehr unspezifisches Enzym; sie verseift alle möglichen Ester. Beim Pektin beruht ihre Wirkung auf der Abspaltung von Methylalkohol; ist sie sehr aktiv, so werden beim Pektin alle Carboxylgruppen frei, dissoziationsfähig, und wir haben eine Pektinsäure vor uns.

Mit löslichen Calcium- und andern Erdalkalisalzen bildet dieses vollständig demethoxylierte Pektin die typische Gallerte (= Calciumpektat).

In beiden Fällen wurden bloss die Exoenzyme, d. s. die in die Nährlösung ausgeschiedenen, bzw. hinausgetretenen Enzyme, berücksichtigt. Testversuche zeigten, dass bei den in Frage stehenden Pilzen für die vorliegende Problemstellung der Endoenzymgehalt des Mycels vernachlässigt werden darf.

Auf Grund der eben skizzierten chemischen Voraussetzungen wurde die quantitative Bestimmung der Pektinase wie folgt durchgeführt. Wirkt Pektinase auf eine Lösung von Natriumpektat ein, so wird nach einer gewissen Zeit die Natriumpektatkette gespalten und die Viskosität des Reaktionsgemisches nimmt ab. Durch Messung dieser Abnahme im Höppeler-Viskosimeter kann die Pektinaseaktivität berechnet werden.

Natriumpektat ist deshalb zu verwenden, weil unsere Nährlösungen neben der zu bestimmenden Pektinase auch noch Pektase enthalten; die Wirkung der letzteren wird durch Natriumpektat blockiert. Nach den neuesten Forschungen ist nämlich die Pektinaseaktivität abhängig vom Veresterungsgrad des abzubauenden Pektins; wäre nun Pektin, statt Natriumpektat, als Substrat vorhanden, so würde die Pektase, je nach ihrer Aktivität, dauernd den Veresterungsgrad verändern; die Pektinaseaktivität würde auf diese Weise als Funktion der Pektaseaktivität gemessen. Nur mit dieser Massnahme sind wir sicher, dass die kettenspaltende Wirkung der Pektinase als ein wirklich unabhängiger Abbau dargestellt wird.

**Ausführung.** Man stellt eine 1-proz. Natriumpektatlösung her. Das Natriumpektat (Deuel und Weber, 1945) wird, wie wenn wir eine Pektinlösung bereiten, vor dem Zugeben des destillierten Wassers gleichmäßig mit 50-proz. Alkohol (1–2 cm<sup>3</sup> je g) befeuchtet. Unter ständigem Umrühren löst sich alles Pektat.

20 cm<sup>3</sup> dieser 1-proz. Natriumpektatlösung werden mit 0,1-n. Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt (Papierindikator Lyphan). Dazu werden 20 cm<sup>3</sup> enzymhaltiger Lösung (deren Pektinasegehalt bestimmt werden soll) und 5 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Ammoniumoxalatlösung gefügt. Das Ammoniumoxalat soll die in der Nährlösung oder im Pilzmycel vorhandenen Calciumionen in Form eines feinen Niederschlags ausfällen. Dieses Reaktionsgemisch

wird jeweils mit 0,1-n. NaOH auf ein  $p_H$  von 5,9 – 6,1 eingestellt und 15 Stunden bei 30° gehalten, dem Aktivitätsoptimum der Pektinase; während dieser Zeit wird ein der Pektinaseaktivität adäquater Teil der Natriumpektatketten gespalten.

Da die spezifische Viskosität auf Grund jener Durchlaufzeit berechnet wird, die das Reaktionsgemisch erreichen würde, wenn die 20 cm<sup>3</sup> Natriumpektat durch die Pektinase zu Bestandteilen abgebaut worden wären, welche die gleiche Durchlaufzeit wie Wasser haben, diente als Kontrollflüssigkeit ein Gemisch von 20 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser, 20 cm<sup>3</sup> enzymhaltiger Lösung und 5 cm<sup>3</sup> Ammoniumoxalat, welches Gemisch ebenfalls 15 Stunden bei 30° gehalten wurde.

Diese spezifische Viskosität, die wir nach einer Abbauzeit von 15 Stunden erhalten, drücken wir in Prozenten der spezifischen Viskosität aus, die zu Beginn, vor der Einwirkung der enzymhaltigen Nährlösung, bestand. Dazu brauchen wir noch eine weitere Kontrollflüssigkeit, die uns die relative Viskositätsaufnahme errechnen lässt und das Vorhandensein einer Pektinase überhaupt anzeigen. Sie enthält 20 cm<sup>3</sup> Natriumpektatlösung, 20 cm<sup>3</sup> inaktivierte (10 Minuten auf 70° erhitzte) enzymhaltige Nährlösung und 5 cm<sup>3</sup> Ammoniumoxalatlösung.

Zur Abstoppung der Enzymeinwirkung wurden beide Gemische mit je 50 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Natronlauge versetzt; dadurch entstand ein  $p_H$  von 13, das jede Enzymaktivität unterband. Jedes Gemisch wurde zuletzt mit destilliertem Wasser bis zur Marke von 100 cm<sup>3</sup> Präzisionsmesskolben aufgefüllt. Die Filtration des Calciumoxalatniederschlages erfolgte in allen Gemischen durch 3 G3 Glasfilternutschen, um möglichst klare Flüssigkeiten zu erhalten.

Die Messungen am Viskosimeter erfolgten im Wasserbad bei 20°.

Bei der quantitativen Bestimmung des Pektase war zu berücksichtigen, dass die Pektaseaktivität je nach dem Salzgehalt und der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung um mehr als das Hundertfache schwanken kann (*Lineweaver und Ballou, 1945; Mac Donnell L. R., Jansen und Lineweaver, 1945*); deshalb wurde stets mit derselben Nährlösung (*Czapek-Dox*) gearbeitet. Wir verwendeten (mehr orientierend) eine grobsinnliche und (für die genaue Arbeit) eine titrimetrische Bestimmungsmethode.

Die grobsinnliche Methode beruht auf der stärkern oder schwächeren Bildung von Calciumpektatgallerte: wir liessen die enzymhaltige Nährlösung auf eine Pektinlösung einwirken; die mit Methylalkohol veresterten Carboxylgruppen wurden durch die Pektase verseift; das beigelegte lösliche Calciumchlorid bildete sofort mit der entstandenen Pektinsäure die steife Calciumpektatgallerte.

Ausführung: Zur Herstellung der 1-proz. Pektinlösung wurde das fein pulverisierte Pektin vor der Zugabe des destillierten Wassers gleichmäßig mit 50-proz. Alkohol (1 – 2 cm<sup>3</sup> je g) befeuchtet. Das destillierte Wasser wurde auf einmal zugegeben, damit die Pektinmolekel nicht untereinander verkleben. Unter beständigem Umrühren löste sich alles Pektin in etwa einer halben Stunde.

10 cm<sup>3</sup> dieser Pektinlösung und 10 cm<sup>3</sup> der enzymhaltigen Nährlösung wurden in 50 cm<sup>3</sup> Erlenmeyer gegossen und mit 0,1-n. Natronlauge auf ein  $p_H$  von 6,2 (Methylrot) eingestellt. Zum eingestellten Flüssigkeitsgemisch wurden einige Calciumchloratkristalle gefügt. Schon nach einer Stunde bei Zimmertemperatur hatte sich die spezifische Reaktion der Pektase vollzogen: in den Erlenmeyern entstand eine mehr oder weniger steife Gallerte. Als Beweis für die methoxylabspaltende Wirkung der Pektase wurde eine 0,1-n. Ammoniumoxalatlösung zur Calciumpektatgallerte gegeben; die Calciumionen wurden durch 2 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> substituiert und die Gelée verflüssigte sich wieder.

Die titrimetrische Methode (*Kertesz*, 1937) beruht auf dem Nachweis der durch die Pektase innerhalb einer bestimmten Zeit (30 Minuten) bei einer bestimmten Temperatur (30°) abgespaltenen Methoxylgruppen.

Ausführung: 10 cm<sup>3</sup> enzymhaltige Lösung wurden zu 30 cm<sup>3</sup> einer 1-proz. Pektinlösung in 100 cm<sup>3</sup> Erlenmeyer gegeben. Mit 0,1-n. Natronlauge wurde dieses Gemisch auf p<sub>H</sub> 6,2 (Methylrot) titriert. Wenn das letzte Rot durch einen Tropfen Alkali verschwunden war, wurden zum eingestellten Gemisch noch 10 cm<sup>3</sup> destilliertes Wasser gefügt.

Der Abbau wurde während 2 Stunden bei 30° verfolgt. Stark aktive Gemische wurden in Intervallen von 5 Minuten jeweils wieder auf das p<sub>H</sub> von 6,2 zurückgebracht. Bei langsam verlaufender Reaktion, d. h. wenn wenig aktive Pektase zugegeben war, wurde die Titration erst nach Ablauf von 2 Stunden vorgenommen; in diesem Falle wurden die verbrauchten cm<sup>3</sup> Natronlauge auf die Abbauperiode von 30 Minuten zurückgerechnet.

Die Anzahl mg des durch 1 cm<sup>3</sup> enzymhaltige Lösung abgespaltenen Methylalkohols entspricht der Anzahl mg Methoxyl (abgespalten in 30 Minuten), dividiert durch die Anzahl cm<sup>3</sup> enzymhaltige Lösung, oder als Bruch ausgedrückt:

$$\frac{\text{Anzahl cm}^3 \text{ verbrauchte } 0,1\text{-n. Natronlauge mal } 3,1}{10 \text{ cm}^3}$$

Die Anzahl mg Methoxyl, die durch die Pektase abgespalten wurden, vergleichen wir mit der gesamten Methoxylmenge, die in 30 cm<sup>3</sup> 1-proz. Pektinlösung vorhanden ist (Methoxylmethode nach *Deuel*, 1943). So erhalten wir die Aktivität unseres Enzyms in %.

Als Versuchspilz verwendeten wir für diese erste Mitteilung *Botrytis cinerea* Pers., der als ein unspezifischer Parasit mancher Blütenpflanzen bekannt ist und z. B. in schlecht gelüfteten Gewächshäusern ein fäulnisartiges Absterben der Laubblätter und der jungen Triebe, auf Kernobst eine Graufäule und auf reifen Weintrauben die Edelfäule verursacht.

## 2. Kapitel. Versuche mit Beigabe von Glucose und Pektin als Kohlenstoffquellen.

**Versuchsfrage:** In welchem Zeitmass wachsen nach erfolgter Beimpfung einer Nährlösung das Mycel trockengewicht des Pilzes und die Menge der von ihm ausgeschiedenen Pektinase und Pektase, wenn als Kohlenstoffquelle zu gleicher Zeit Glucose und Pektin geboten werden?

Es ist bekannt, dass einige parasitische Pilze für den ersten Start Hexosen benötigen und erst nach einer gewissen Anlaufzeit andere Kohlehydrate in grösserem Umfange abbauen. Aus diesem Grunde erhielt unser Versuchspilz in der vorliegenden ersten Versuchsreihe je 1% Glucose und Pektin als Kohlehydratquellen zur Verfügung gestellt.

Je Liter *Czapek-Dox*-Lösung, enthaltend 3 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl und 0,01 g FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O kryst., wurden 10 g Glucose aufgelöst. Das Gemisch wurde unter ständigem Rühren zu 10 g mit Alkohol befeuchtetem Pektin gegeben und aufgekocht. Nach dem Abkühlen sedimentierte ein Teil des Pektins als Gallerte. Die überstehende Lösung wurde dekantiert und zentrifugiert. Der Pektингehalt der klaren Lösung, bestimmt nach *Deuel* (1943), betrug noch 0,49%.

85 Erlenmeyer (Muranoglas, 400 cm<sup>3</sup>) wurden mit je 200 cm<sup>3</sup> dieser Lösung beschickt, während drei aufeinanderfolgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert und hernach im Impfkasten mit je 1 cm<sup>3</sup> einer Sporensuspension von *Botrytis cinerea* beimpft; diese enthielt ungefähr 425000 Sporen je cm<sup>3</sup>. Bebrütungstemperatur 24°.

In Intervallen von je 24 Stunden wurden 5 Kolben aufgearbeitet. Zu jedem Kolben wurden zur Abtötung des Pilzes 2 cm<sup>3</sup> Toluol gefügt. Hernach wurde das Pilzmycel in tarierten Filtern aufgefangen, mit lauem destilliertem Wasser sorgfältig ausgewaschen, luftgetrocknet, hernach 4 Stunden bei 103° getrocknet und zurückgewogen. In der Nährlösung selbst wurde nach der eben beschriebenen Methode der Pektinase- und der Pektasegehalt bestimmt.

Sämtliche Zahlen entsprechen dem arithmetischen Mittel aus 5 Einzelbestimmungen aus den 5 zusammengehörenden Kolben. Diese Arbeitsmethode birgt den Nachteil, dass wir den Verlauf der Pektinase- und Pektase-Aktivität nicht in ein und demselben Kolben während der ganzen Versuchsdauer verfolgen, sondern die mutmassliche ideale Aktivitätskurve aus einer grösseren Zahl von verschiedenen Kolben, die sukzessive aufgearbeitet werden, rekonstruieren. Jeder Versuchskolben stellt jedoch eine biologische Individualität dar und entwickelt sich je nach den innern Zufälligkeiten etwas anders als alle übrigen; obschon also unsere sämtlichen Werte arithmetische Mittel aus fünf Parallelbestimmungen aus fünf Parallelkolben darstellen, sind sie aus diesem Grunde mit verhältnismässig grossen Schwankungen behaftet.

Die Ergebnisse der Glucose-Pektin-Versuchsreihe sind in Tab. 1 zusammengestellt und in Figur 1 veranschaulicht. Das Myceltrockengewicht steigt nach einer Anlaufzeit von 6 Tagen steil an; etwa 21 Tage nach Versuchsbeginn ist der Mycelzuwachs zur Hauptsache abgeschlossen.

Tabelle 1.

Der Ernteertrag (Myceltrockengewicht) und die Pektinase- und Pektaseproduktion von *Botrytis cinerea* Pers. in einer Glucose- und Pektin-haltigen Nährlösung (Versuch 1).

Tage nach Versuchsbeginn	Ernteertrag Myceltrockengewicht mg	Pektinase %	Pektase %
1	31 ± 9	5,30 ± 3,5	0
2	27 ± 15	5,80 ± 2,5	0
3	32 ± 9	4,40 ± 3,6	0
4	44 ± 12	4,42 ± 1,6	0
5	74 ± 8	15,50 ± 7,7	0,42 ± 0,1
6	83 ± 11	26,20 ± 4,9	0,52 ± 0,1
7	181 ± 24	64,75 ± 6,6	1,36 ± 0,3
8	212 ± 25	71,44 ± 6,0	2,76 ± 0,5
10	341 ± 24	89,43 ± 3,0	6,57 ± 0,1
11	408 ± 46	90,33 ± 4,8	6,63 ± 0,7
12	513 ± 30	84,72 ± 2,9	6,84 ± 0,6
13	610 ± 17	87,71 ± 1,0	5,81 ± 0,3
14	724 ± 40	71,30 ± 4,5	5,72 ± 0,3
21	827 ± 33	84,98 ± 2,1	8,11 ± 0,8
28	867 ± 22	62,92 ± 8,9	7,31 ± 0,6

Die Pektinase, also das spezifische Pektin-zerteilende Enzym, erscheint schon am ersten Tag nach Versuchsbeginn in einer Aktivität von 5% und steigt nach dem 4. Tag steil auf einen Höhepunkt von 80—90% an. Dieser wird bereits nach einer Wachstumszeit von

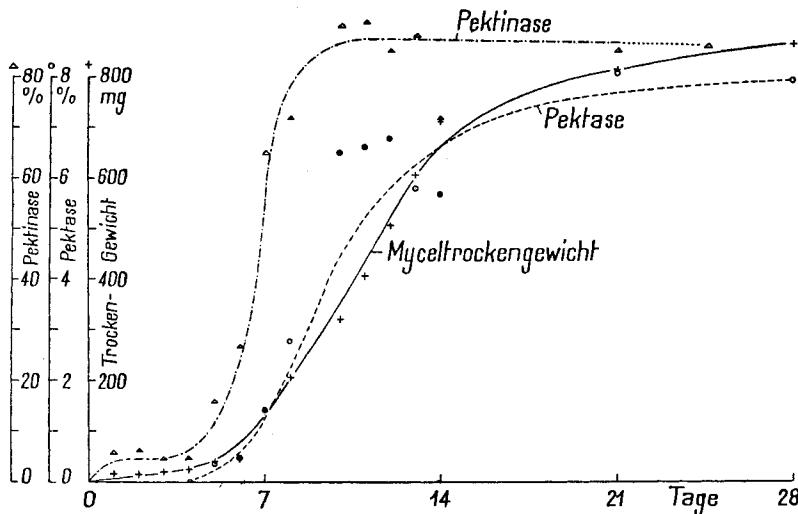


Fig. 1.

*Botrytis cinerea* Pers. Der Verlauf des Mycel-trockengewichtes und der Pektinase- und Pektase-Aktivität, wenn zu gleicher Zeit Glucose und Pektin als Kohlenstoffquellen geboten werden.

10 Tagen erreicht und hernach nicht mehr überschritten. Der Abschlusswert nach einer Wachstumszeit von 28 Tagen fällt durch eine Zufälligkeit etwas aus dem Rahmen. Die Pektinaseaktivität eilt somit zwischen dem 4. und dem 10. Wachstumstag der Kurve des Mycel-trockengewichtes deutlich voraus; sie schafft offenbar eine der Voraussetzungen für den Anstieg des Ernteertrages.

Die Pektase, also das unspezifische demethoxylierende Enzym, ist während der ersten 4 Wachstumstage auch nicht in Spuren nachzuweisen. Erst am 5. Tag tritt sie in Erscheinung und folgt sodann in ihrem Kurvenverlauf weitgehend der Kurve des Ernteertrages; sie erreicht, wie diese, etwa am 21. Wachstumstag ihren Höhepunkt.

### 3. Kapitel. Versuche mit ausschliesslicher Beigabe von Pektin als Kohlenstoffquelle.

Die Versuchsfrage ist bei dieser Versuchsreihe dieselbe wie in der vorangehenden Serie, mit dem Unterschied, dass als Kohlenstoffquelle ausschliesslich Pektin geboten wird.

Wie dort, so wurde auch hier der ursprünglichen Nährlösung 1% Pektin beigegeben; nach Dekantierung des Sedimentes betrug der Pektингehalt der klaren Nährflüssigkeit noch 0,54%. Die Sporensuspension enthielt rund 320 000 Sporen je  $\text{cm}^3$ . Die Voraussetzungen

stimmen somit in beiden Versuchsreihen überein. Zur allgemeinen Orientierung wurde in der vorliegenden Versuchsreihe bei Anlass der Ernte auch die jeweilige Wasserstoffionenkonzentration der Kulturflüssigkeit bestimmt. Sie verläuft während der ersten drei Versuchswochen sehr gleichmässig und verschiebt sich erst nach Erschöpfung der Nährstoffvorräte zum Neutralpunkt hin.

Tabelle 2.

Der Ernteertrag (Myceltrockengewicht) und die Pektinase- und Pektaseproduktion von *Botrytis cinerea* Pers. in einer Pektin-haltigen Nährlösung (Versuch 2).

Tage nach Versuchsbeginn	Ernteertrag Mycel-trockengewicht mg	Wasserstoffionenkonzentration der Kulturflüssigkeit pH	Pektinase %	Pektase %
0	—	3,1	—	—
1	0	3,1	4,12 ± 3,1	0
2	0	3,01	20,5 ± 4,9	0
3	5 ± 1	3,26	6,5 ± 1,3	0
4	34 ± 15	3,12	10,2 ± 3,9	0
5	35 ± 13	2,96	10,02 ± 1,3	0,33 ± 0,03
6	77 ± 16	3,09	15,6 ± 1,2	0,43 ± 0,04
7	68 ± 11	3,11	18,4 ± 2,7	0,48 ± 0,06
8	83 ± 11	3,07	28,7 ± 3,3	0,63 ± 0,07
9	96 ± 12	3,02	40,94 ± 4,4	0,68 ± 0,09
10	110 ± 11	3,13	52,08 ± 5,8	1,20 ± 0,16
11	136 ± 13	3,17	52,9 ± 3,6	1,45 ± 0,15
12	165 ± 11	3,34	84,94 ± 3,0	1,93 ± 0,09
13	248 ± 18	3,30	78,6 ± 14,8	2,43 ± 0,36
14	239 ± 29	3,50	92,1 ± 0,9	2,89 ± 0,13
21	522 ± 40	4,93	60,72 ± 13,4	7,86 ± 0,29
28	398 ± 18	7,14	63,8 ± 5,9	8,35 ± 0,53

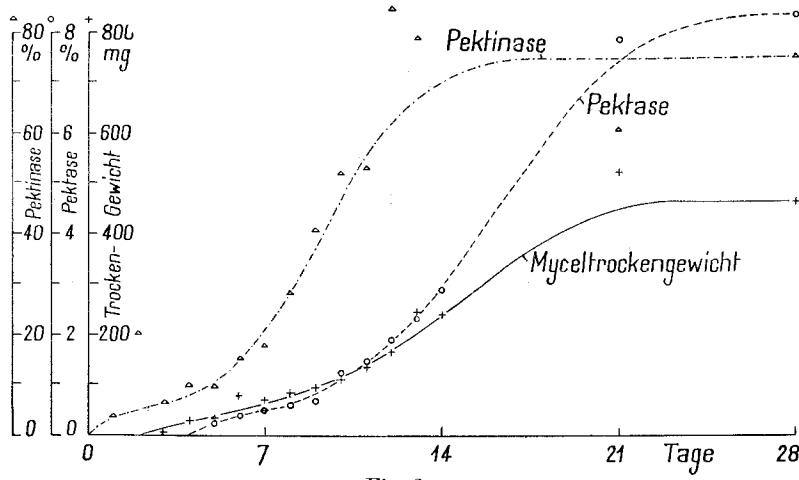


Fig. 2.

*Botrytis cinerea* Pers. Der Verlauf der Mycel-trockengewichte und der Pektinase- und Pektase-Aktivität, wenn als Kohlenstoffquelle ausschliesslich Pektin geboten wird.

Das Myceltrockengewicht steigt in einem ähnlichen Rhythmus wie in der Glucose-Pektin-Reihe an, jedoch langsamer, so dass der Ernteertrag nach vier Wochen, bei Abbruch des Versuches, nur rund halb so gross ist.

Auch die mittlere Kurve der Pektinase-Aktivität stimmt weitgehend mit der entsprechenden Kurve in Figur 1 überein: nach einer kurzen Anlaufzeit von 5—6 Tagen steigt sie innerhalb einer Woche steil empor und bleibt dann auf dem Bereich von rund 70—80 % ungefähr konstant.

Ähnliches gilt für die Pektase. Sie tritt, wie im Glucose-Pektin-Versuch, erst am 5. Tag in Erscheinung und steigt dann steil auf eine Aktivität von rund 8 % empor.

#### 4. Kapitel. Versuche mit ausschliesslicher Beigabe von Glucose als Kohlenstoffquelle.

Die Versuchsfrage ist dieselbe wie in den vorangehenden Serien, mit dem Unterschied, dass als Kohlenstoffquelle ausschliesslich 1 % Glucose geboten wird. Die als Impfmaterial dienende Sporensuspension enthielt rund 410 000 Sporen je cm<sup>3</sup>.

Tabelle 3.

Der Ernteertrag (Myceltrockengewicht) und die Pektinase- und Pektaseproduktion von *Botrytis cinerea* Pers. in einer Glucose-haltigen Nährlösung (Versuch 3).

Tage nach Versuchs- beginn	Ernteertrag Mycel- trockengewicht mg	Wasserstoffionen- konzentration der Kulturflüssigkeit pH	Pektinase	Pektase
			%	%
0	—	5,29	—	—
1	6 ± 3,1	5,12	11,8 ± 5,9	0
2	0	5,45	71,8 ± 5,3	0,23 ± 0,02
3	2 ± 3,0	5,91	81,7 ± 3,5	0,20 ± 0,02
4	29 ± 9,6	6,07	79,2 ± 9,41	0,15 ± 0,00
5	57 ± 19,0	6,10	79,08 ± 8,8	0,30 ± 0,00
6	81 ± 42,0	5,91	55,3 ± 18,59	0,44 ± 0,07
7	93 ± 37,0	6,40	52,1 ± 20,3	0,42 ± 0,07
8	179 ± 16	6,40	76,5 ± 6,71	0,39 ± 0,08
9	224 ± 12	6,64	63,4 ± 17,0	0,36 ± 0,08
10	246 ± 23	6,85	34,7 ± 10,5	0,46 ± 0,05
11	259 ± 14,7	7,01	84,8 ± 2,5	0,42 ± 0,09
12	260 ± 20,9	7,01	71,3 ± 8,47	0,60 ± 0,05
13	328 ± 29,3	6,96	47,8 ± 10,1	0,63 ± 0,07
14	320 ± 20,7	7,30	69,60 ± 9,2	0,99 ± 0,20
21	463 ± 44,9	6,96	74,5 ± 6,1	0,57 ± 0,14
28	636 ± 22,2	7,32	88,2 ± 1,5	0,66 ± 0,16

Die Kurve des Myceltrockengewichtes steigt erheblich langsamer an als in den vorangehenden Versuchen und ist bei Abbruch des Versuches, nach 28 Tagen, noch nicht auf ihrem Höhepunkt angelangt. Diese zögernde Entwicklung wird offenbar durch einen Mangel an gewissen Wuchsstoffen bedingt, die im Pektin vorhanden sind, der reinen Glucose dagegen fehlen.

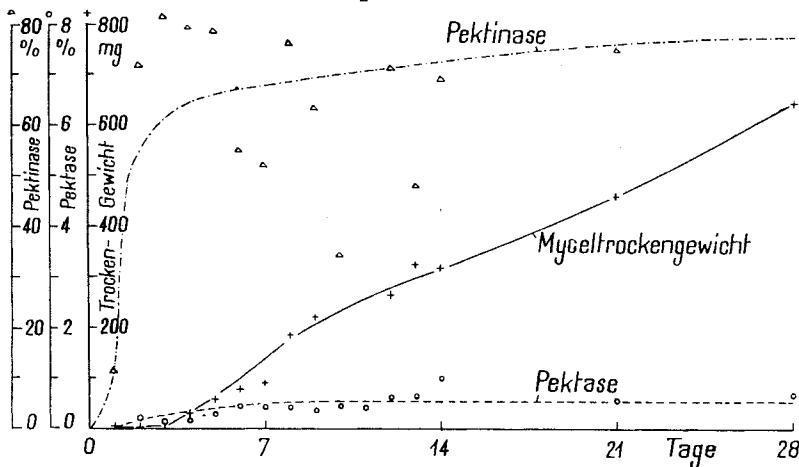


Fig. 3.

*Botrytis cinerea* Pers. Der Verlauf der Myceltrockengewichte und der Pektinase- und Pektase-Aktivität, wenn als Kohlenstoffquelle ausschliesslich Glucose geboten wird.

Trotz dieser langsamen Gewichtszunahme der Myceldecken verläuft die Pektinase-Produktion ungefähr im selben Rhythmus wie in den beiden vorangehenden Versuchsreihen. Schon am 2. Tag nach Versuchsbeginn weist die Nährflüssigkeit in den Kulturkolben eine Pektinase-Aktivität von über 70 % auf und verharrt dann, mit grossen individuellen Schwankungen, bis zum Abbruch der Versuche auf diesem Niveau.

Die Pektase-Produktion geht dagegen völlig neue Wege. Im Gegensatz zu den pektinhaltigen Nährösungen der 1. und 2. Versuchsreihe, bei welchen die Pektase erst etwa am 5. Tag in Erscheinung trat und dann dauernd anstieg, lässt sich die Pektase in den nur glucosehaltigen Kulturkolben schon am 2. Tag in sehr geringen Mengen nachweisen; sie bleibt jedoch von da weg bis zum 28. Tag auf dem niedern Betrag von rund 0,4—0,9 % stehen. Ohne Pektin in der Nährflüssigkeit bildet somit *Botrytis cinerea* die Pektase nur in äusserst beschränktem Umfange.

##### 5. Kapitel. Ergebnisse.

Wir gingen bei der Disposition unserer Versuche von der Vermutung aus, dass die konstitutiven und die adaptiven Enzyme im

reinen Sinne des Wortes nur als Extreme des Verhaltens aufzufassen seien; so stellt die Amylase-Produktion des eingangs genannten *Wortmann'schen* Bakteriums ein Schulbeispiel eines extrem adaptiv gebildeten Enzyms dar. Wahrscheinlich kommen auch bei den pflanzenbewohnenden parasitischen Pilzen derartige extreme Fälle vor; wir gedenken, über sie in einer späteren Arbeit zu berichten.

Bei den zwei Enzymen, die in der vorliegenden Untersuchung studiert wurden, nämlich bei der Pektinase und der Pektase, liegen dagegen die Verhältnisse von vornehmerein etwas anders; diese beiden Enzyme sind wohl für sämtliche pflanzenpathogenen Pilze lebensnotwendig und werden wahrscheinlich von ihnen allen gebildet; sonst könnten ja diese Pilze in den pflanzlichen Geweben überhaupt nicht gedeihen. Es war deshalb von vornehmerein nicht zu erwarten, dass *Botrytis cinerea* auf die Anwesenheit oder auf das Fehlen von Pektin in der Nährlösung nach dem Alles-oder-Nichts-Schema antworten würde; sondern es war ein intermediäres Verhalten zu vermuten, also eine erhebliche quantitative Stimulierung der Pektin-abbauenden Enzyme durch das Pektin.

Diese Erwartung ging denn auch in Erfüllung, nur anders als vorauszusehen war. Wir hatten erwartet, dass entweder die Bildung beider Enzyme durch das Pektin stimuliert würde, oder dann doch die Produktion der Pektinase, welche die Pektatketten spezifisch spaltet, nicht aber die Produktion der unspezifischen Pektase, welche die Pektine demethoxyliert.

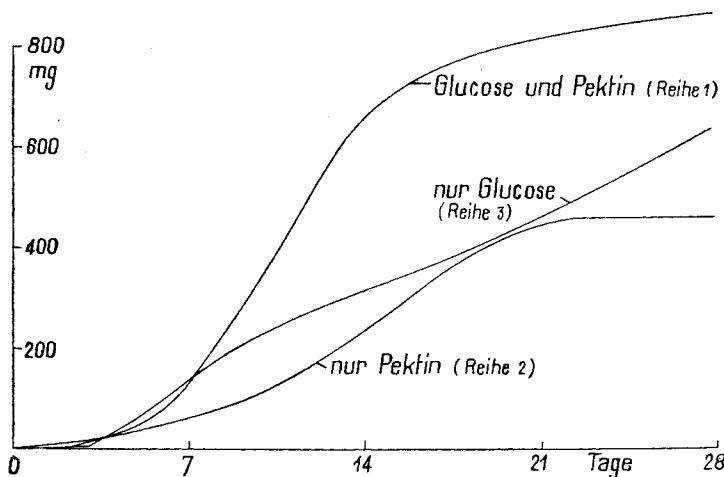


Fig. 4.

*Botrytis cinerea* Pers. Die Zunahme des Mycel-trockengewichtes, wenn als Kohlenstoffquelle Pektin und Glucose, nur Pektin oder nur Glucose geboten wird.

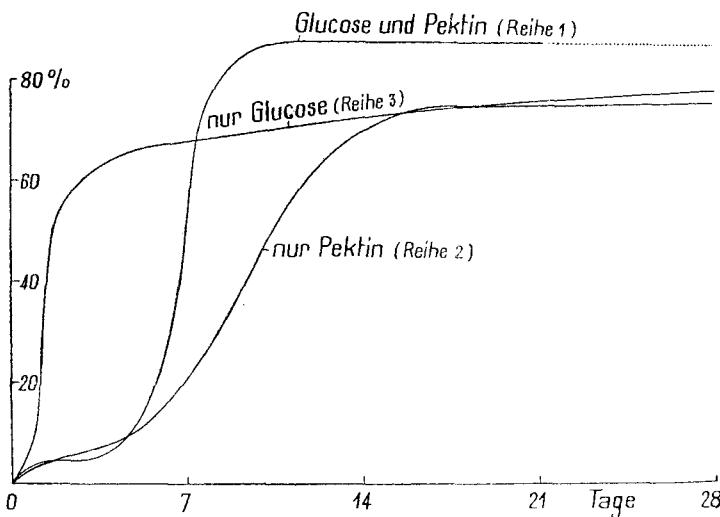


Fig. 5.

*Botrytis cinerea* Pers. Die Zunahme der Pektinase-Aktivität der Kulturflüssigkeit, wenn als Kohlenstoffquelle, Pektin und Glucose, nur Pektin oder nur Glucose geboten wird.

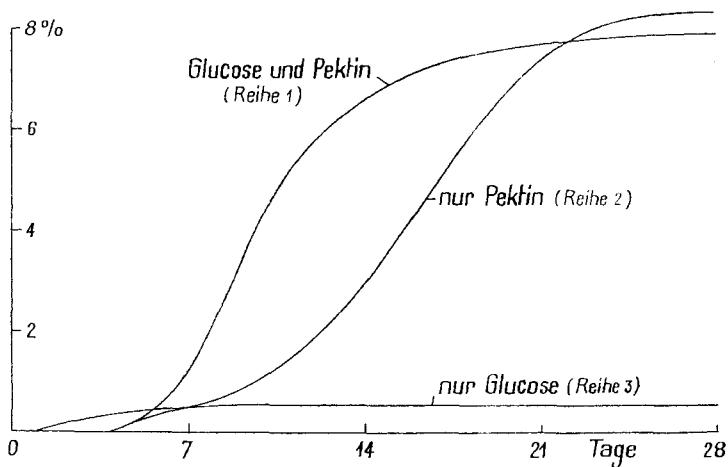


Fig. 6.

*Botrytis cinerea* Pers. Die Zunahme der Pektase-Aktivität der Kulturflüssigkeit, wenn als Kohlenstoffquelle Pektin und Glucose, nur Pektin oder nur Glucose geboten wird.

In Wirklichkeit werden bei *Botrytis cinerea* auf dieser Nährlösung nicht beide Enzyme in ihrer Produktion durch Pektin stimuliert, sondern nur eines, und zwar nicht die Pektinase, sondern die Pektase; nur diese zeigt somit ausgeprägt adaptiven Charakter.

Die Produktion der Pektinase wird somit bei *Botrytis cinerea* rein konstitutiv gesteuert; wenn sie auf die Art der Nährflüssigkeit überhaupt anspricht, dann eher in einem negativen Sinne, indem die Anwesenheit von Pektin in der Nährlösung ihre Produktion eher verzögert. Kennzeichnend ist ja in den Figuren 1—3, dass die Pektinase-Produktion dem Mycelwachstum stark vorausseilt; am stärksten geschieht dies jedoch, wie Figur 5 veranschaulicht, in Reihe 3, deren Nährlösung kein Pektin, nur Glucose, enthält, weniger stark in Reihe 1, die neben Glucose auch Pektin als Kohlenstoffquelle aufweist, und am schwächsten in Reihe 2, die nur Pektin erhielt. Es sieht fast aus, als ob die Anwesenheit von Pektin die Pektinase-Produktion verlangsamen würde.

Im Gegensatz zu dieser konstitutiv verankerten Produktion der Pektinase wird die Bildung der Pektase bei *Botrytis cinerea* adaptiv durch die Anwesenheit von Pektin stark beeinflusst. Während in Figur 6 die Pektase-Aktivität sowohl in Kurve 1 als in Kurve 2 (Nährlösungen mit Glucose und Pektin bzw. bloss mit Pektin) nach Ablauf von drei Wochen ungefähr dieselbe optimale Aktivität von rund 8 % erreicht, bleibt die Pektase-Aktivität in der Reihe 3 (nur Glucose) etwa 10—20mal kleiner; und zwar ist sie vom Mycelwachstum weitgehend unabhängig; schon in den ersten Tagen nach Versuchsbeginn wird bei einem Myceltrockengewicht von rund 80 mg eine Pektasemenge gebildet, die einer Aktivität von 0,44 % entspricht, und diese selbe Aktivität bleibt bis zum Abbruch des Versuches erhalten, d. i. bis zu einem Mycelgewicht von rund 640 mg.

Es wäre verfrüht, aus diesem eigenartigen Verhalten schon jetzt Schlussfolgerungen auf die parasitische Eignung von *Botrytis cinerea* zu ziehen. Wir möchten hierfür das Ergebnis unserer späteren Untersuchungen abwarten.

### Zusammenfassung.

Es wurde die Frage geprüft, ob und in welchem Umfange bei *Botrytis cinerea* Pers. die Bildung von Pektinase und von Pektase durch den Pektингehalt einer bestimmten Nährlösung beeinflusst wird. Die Pektinase, welche die Pektatkette aufspaltet, erwies sich dabei als ein konstitutives Enzym, das unabhängig von der chemischen Zusammensetzung der Nährlösung entsteht. Die unspezifische Pektase, welche die Pektine demethoxyliert, erwies sich dagegen als ein weitgehend adaptives Enzym, das nur in Gegenwart von Pektin reichlich, ohne Pektin dagegen bloss in Spuren gebildet wird.

### Zitierte Literatur

H. Deuel, 1943. Pektin als hochmolekularer Elektrolyt. (Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. 34, 41—51).

- H. Deuel und F. Weber, 1945.* Über die Viskosität wässriger Lösungen von Pektinstoffen, besonders von Natriumpektaten. (*Helv.* **28**, 1089—1110.)
- R. J. Dubos, 1940.* The adaptive production of enzymes by bacteria (Bacteriol. Rev. **4**, 1—16).
- E. Gämänn, 1946.* Pflanzliche Infektionslehre. Birkhäuser, Basel, 611 S.
- L. H. Huie, 1897.* Changes in the cell-organs of *Drosera rotundifolia*, produced by feeding with egg-albumen. (*Quart. J. Microsc. Sci.*, **39**, 1—39).
- L. H. Huie, 1899.* Further studies of cytological changes produced in *Drosera*. (l. c. **42**, 203—222).
- H. Karström, 1938.* Enzymatische Adaption bei Mikroorganismen. *Erg. Enzymf.* **7**, 350—376.
- Z. I. Kertesz, 1937.* Pectic enzymes. I. The determination of pectinmethoxylase activity. (*J. Biol. Chem.* **121**, 589—598).
- H. Lineweaver and G. A. Ballou, 1945.* The effect of cations on the activity of Alfalfa Pectinesterase (Pectase). (*Arch. Biochem.* **6**, 373—387).
- F. E. Lloyd, 1942.* The carnivorous plants. *Chron. Bot. Waltham Mass.*, **253** S.
- L. R. MacDonell, E. F. Jansen and H. Lineweaver, 1945.* The properties of Orange Pectinesterase. (*Arch. Biochem.* **6**, 389—401).
- J. Oudman, 1936.* Über Aufnahme und Transport N-haltiger Verbindungen durch die Blätter von *Drosera capensis* L. (*Rec. trav. bot. néerland.*, **33**, 351 433).
- J. P. Pawlow, 1926.* Die höchste Nerventätigkeit (das Verhalten) von Tieren. 3. Aufl., München, 330 S.
- A. Quintanilha, 1926.* O problema das plantas carnívoras. Coimbra, 88 S.
- J. Wortmann, 1882.* Untersuchungen über das diastatische Ferment der Bakterien. (*Z. physiol. Ch.* **6**, 287—329).
- J. Yudkin, 1938.* Enzyme variation in micro-organisms. (*Biolog. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, **13**, 93—106).
- J. de Zeeuw, 1934.* Versuche über die Verdauung in Nepentheskannen. (*Bioch. Z.* **269**, 187—195).

Institut für spezielle Botanik der  
Eidg. Techn. Hochschule in Zürich.