

## CHARAKTERISIERUNG EXTRAZELLULÄRER PROTEINE UND ENZYME AUS PEKTINKULTURFILTRATEN VON *BOTRYTIS CINEREA*\*

F. DRAWERT und M. KREFFT†

Institut für Lebensmitteltechnologie und Analytische Chemie der Technischen Universität München Lehrstuhl für Chemisch-technische Analyse und chemische Lebensmitteltechnologie, D-8050 Freising-Weihenstephan, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 2 Januar 1978)

**Key Word Index**—*Botrytis cinerea*; fungus; extracellular proteins; enzymes; protein pattern; zymograms.

**Abstract**—Extracellular proteins from *Botrytis cinerea* CBS 144.55 were separated by use of isoelectric focusing in polyacrylamide gel and thin layer isoelectric focusing. In addition to the protein pattern, the activities of protease, amylase, cellulase, polygalacturonase, pectinesterase and glycosidases were determined.

### EINLEITUNG

Nachdem festgestellt wurde unter welchen Bedingungen die extrazellulären Proteine isoliert werden können und, daß die Verteilungsmuster der extrazellulären Proteine von der Zusammensetzung des Nährmediums abhängig sind (induzierbar; [1]) sollten die Proteine und Enzyme eines Mediums und eines *Botrytis cinerea*-Stammes charakterisiert werden.

\* Über *Botrytis cinerea*, den Erreger der Edelfäule bei Trauben. III. Für II. Mitt. Drawert, F. und Krefft, M. (1978) *Lebensm.-Wiss. Technol.* im Druck.

† Auszug aus der Dissertation, TU München 1977.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Proteinverteilungsmuster der extrazellulären Proteine, untersucht mit der Dünnschicht-isoelektrischen Fokussierung (DIEF), ist mit seinem pH-Gradienten zusammen mit dem Densitogramm in Abb. 1 dargestellt. Aus Abb. 1 ist zu ersehen, daß die mengenmäßig überwiegenden Proteine im sauren pH-Bereich lokalisiert werden.

Bei der Auftrennung von mikrobiellen Proteinen mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung treten einige Probleme auf, die bereits beschrieben worden sind [2]. Häufig wurden hier die Proteinauftrennungen durch

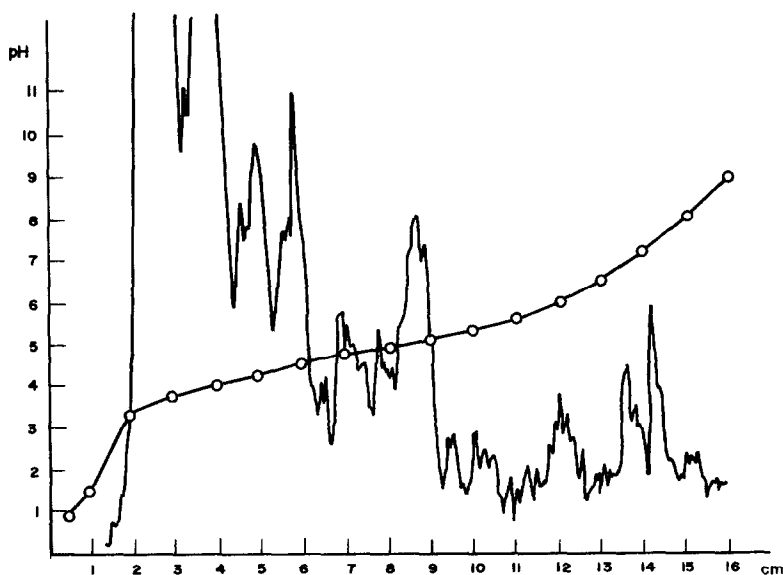


Abb. 1. Proteinverteilungsmuster der extrazellulären Proteine von *Botrytis cinerea* CBS 144.55, gewonnen durch DIEF pH 2–11 und 3–5 (3:1). Trägergel: Bio-Gel P-60 minus 400 mesh. — Densitogramm. —○— pH-Gradient (4°).

Aggregationseffekte der Proteine mit Nucleinsäuren oder anderen Substanzen, wie Kohlenhydrate oder Phospholipide gestört. Die Empfehlungen von Wadström und Smyth [2], 4M Harnstofflösung in die Probe zuzusetzen, führte nicht zum Erfolg. Auch der Zusatz von Saccharose (1%), das Auftragen der Probe an verschiedenen Stellen des Gels oder eine Variation der Fokussierungszeiten brachten keine guten Resultate. Ausschlaggebend für eine scharfe Trennung der Proteine waren folgende Bedingungen: eine genügend hohe Proteinkonzentration nach vollständiger Entsalzung durch Dialyse sowie eine bestimmte Fokussierungsdauer (vgl. exp. Teil) und die Auftragung der Proben im ersten Drittel der Laufstrecke in Anodennähe.

Die extrazellulären Proteine von *Botrytis cinerea* CBS 144.55, isoliert aus einem Pektinkulturfiltrat konnten mit Hilfe der Dünnschichtgelchromatographie [3] in zwei Fraktionen vom Molekulargewicht ca 64500 und 120000 dalton aufgetrennt werden.

Von den extrazellulären Enzymen, die untersucht werden sollten, waren besonders jene von Interesse, die am Infektionsvorgang von *Botrytis cinerea* beteiligt sind. Bereits nachgewiesen für *Botrytis cinerea* waren Cutinasen [4, 5], Pektinasen [6, 7] und Cellulasen [8].

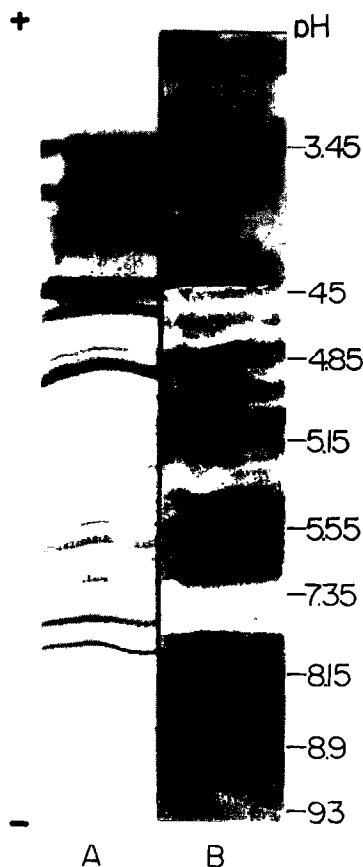


Abb. 2. Proteinverteilungsmuster und Amylasezymogramm, gewonnen durch PAGIEF pH 2–11. (A) Proteinverteilungsmuster der extrazellulären Proteine aus Pektinkulturfiltrat von *Botrytis cinerea* CBS 144.55. (B) Amylase-Isoenzyme aus Pektinkulturfiltrat von *Botrytis cinerea* CBS 144.55. Enzymnachweis: Stärke und Jod-Kaliumjodid.

Für eine Beteiligung dieser Enzyme am Vorgang der Durchdringung der äußeren Schicht von Trauben lagen bereits vergleichbare Ergebnisse vor [9–14]. Protease-Aktivität unter den extrazellulären Enzymen konnte nicht nachgewiesen werden.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht ist unter den extrazellulären Enzymen Amylase vorhanden. Amylase-Aktivität tritt in einer doppelten Hauptbande mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 7.35 und in mehreren nicht so aktiven Isoenzym-Banden mit einem pI im Bereich 4.5 auf.

Geringe Cellulase-Aktivität drückte sich durch sechs Enzymbanden aus. Die Cellulase-Isoenzyme waren nur bei vergleichsweise hohen Proteinkonzentrationen in der Probe (0.36 mg Protein/cm) nachweisbar. Bei Polygalakturonase waren mehrere Enzym-Banden festzustellen. Bei der aufgetragenen Proteinmenge von 0.21 mg Protein/cm, traten vier Isoenzyme mit einem pI im pH-Bereich 4 auf. Bei einer Erhöhung der Proteinkonzentration in der Probe trennen sich die vier Isoenzyme nicht mehr auf.

Pektinesterase ist wie Abb. 3 zeigt, ebenfalls mit mehreren Isoenzymen vorhanden. Da die Pektinanfärbung nicht haltbar ist, wurde das Zymogramm abgezeichnet. Bei einer Proteinkonzentration der Probe von 0.065 mg/cm können zehn Pektinesterase-Isoenzym-Banden nachgewiesen werden. Bei den zehn Isoenzym-Banden handelt es sich um sieben Isoenzyme mit ihrem pI im pH-Bereich 7.0–8.0 und um drei Isoenzyme mit ihrem pI im pH-Bereich 4.0–5.0. Werden höhere Proteinkonzentrationen auf das Gel aufgetragen (z.B. 0.13 mg Protein/cm), sind im pH-Bereich 7.0–8.0 nur noch vier breite Isoenzym-Banden zu sehen; eine Unterscheidung in mehrere Banden ist dann nicht mehr möglich. Dafür werden vier weitere Banden sichtbar: zwei mit einem pI im pH-Bereich von 4.5–4.8, eine mit einem pI im pH-Bereich von 4.0.

Vergleicht man die Proteinverteilungsmuster der Abb. 1 und 3 miteinander, dann erkennt man, daß das Grundmuster gleich ist. Variationen vom Grundmuster ergeben sich z.B. bei Abb. 1 dadurch, daß die Proteine, die ihre isoelektrischen Punkte im pH-Bereich 3–5 haben, durch Mischung des Ampholyten pH 2–11 und pH 3–5 'gespreizt' wurden, um eine bessere Differenzierung der Proteinbanden in diesem Bereich zu erhalten. Unterschiedliche Proteinkonzentrationen können zur klaren Differenzierung in bestimmten pI-Bereichen vorteilhaft sein; indessen sind die mit unterschiedlichen Proteinmengen erzielbaren Pherogramme durch Überladungseffekte in Teilbereichen zwangsläufig voneinander verschieden. Die aufzutragende Proteinmenge pro Zentimeter Trennfläche ist bereits in Vorversuchen zu ermitteln, um eine möglichst optimale Visualisierung der Enzyme zu erreichen. Bei Abb. 1 sind 0.26 mg Protein/cm; und bei Abb. 3 0.065 mg Protein/cm aufgetragen worden. Tabelle 1 zeigt die Prüfung des Kulturfiltrats auf Glycosidasen. Die Nachweise waren nur dann deutlich, wenn geringe Proteinmengen (40 µg Protein/cm) aufgetragen wurden.

#### EXPERIMENTELLES

*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. st. acc. *Sclerotinia fuckeliana* (de Bary) Fuckel aus der Sammlung von CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland) CBS 144.55. Pektin-Kulturmedium, 5.0 g Pektin (Roth); 2.5 ml Tween 80; 1.0 g  $K_2HPO_4$ .

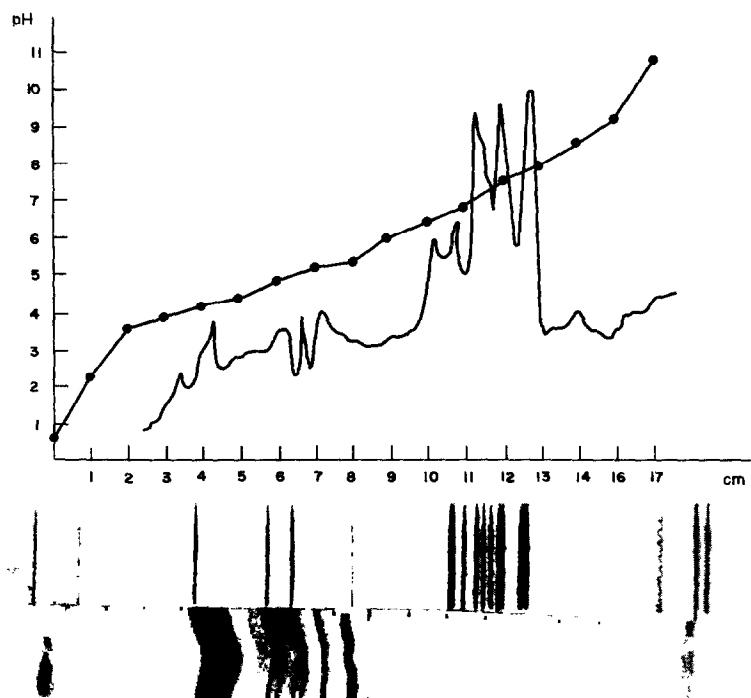


Abb. 3. Proteinverteilungsmuster und Pektinesterasezymogramm mit Densitogramm und pH-Gradient, gewonnen durch DIEF pH 2-11, Trägergel Bio Gel P-60 minus 400 mesh. Pektinesterase Nachweis: Pektin und Hydroxylammoniumchlorid/Eisenchlorid. — Densitogramm der Isoenzyme der Pektinesterase. - - - pH-Gradient (4°). Zymogramm(nachgezeichnet), darunter das Proteinverteilungsmuster.

3.0 NaNO<sub>3</sub>; 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.5 g KCl; 0.01 g FeSO<sub>4</sub> auf 1 l. Aqua dest. (pH 4.2). Schüttelkulturen in Schikanekolben nach Beimpfen mit Mycel und Sporen aus einer Reinkultur; Inkubation 19 Tage lang auf einer Rundsüttelmaschine Typ G 25 von New Brunswick Scientific (USA) bei ca 23° und 130 upm. Isolierung der extrazellulären Proteine: Mycel abfiltrieren, das Kulturfiltrat mit Ammoniumsulfat (95%ige Sättigung) fällen, Fällung abzentrifugieren (33000 g, 15 min, 4°, SS-34 Rotor, Sorvall), dialysieren gegen Wasser bei 4°, zentrifugieren (wie oben) und Proteinlösung durch Ultrafiltration (Amicon) konzentrieren. Proteinbestimmung und Durchführung der isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen (PAGE) wie beschrieben [1]. Dünnschicht-isoelektrische Fokussierung (DIEF) mit granulierten Gelen (Bio Gel P-60) [15]: 100 ml gewaschenes Gel [16] mit 1.25 % g/v Trägerampholyte 'Servalyt' pH 2-11 versetzen und 20 × 20 cm Glasplatten beschichten (ca 0.6 mm). Die Proben mit einem Applikator (Desaga) mit Objektträger oder Deckglas auftragen.

Fokussierung in einer Doppelkammer (Desaga) bei Anwendung von Platinband-Elektroden. Elektrodenlösungen: 0.2 M Schwefelsäure (Anode) und 0.4 M Äthylendiamin (Kathode). Spannung während der Fokussierung: in den ersten 4 Stunden 200 V, dann Erhöhung der Spannung in jeder Stunde um 200 V, Endspannung: 800 V. Fokussierung der Proben für Glycosidase-Nachweise 14 Stunden bei 200 V, danach je 1 Stunde bei 400, 600 und 800 V. Proteinnachweis als Papier-Abklatsch und Anfärbung mit 0.2% Coomassie Brilliant Blau [15]. Densitometrische Auswertung der Proteinfärbung in Remission im Spektrodensitometer Vitatron TLD 100 bei 619 nm. Bestimmung der isoelektrischen Punkte mit einer Einstabelektrode (Ingold-Frankfurt) durch pH-Messung bei 4°, oder durch gleichzeitige Fokussierung von pH-Markerproteinen mit bekannten isoelektrischen Punkten [15].

**Enzymnachweise.** **Protease.** Gel auf ein Whatman Papier Nr. 3 (zuvor in einer 0.3% Caseinlösung in 0.3 M Trispuffer pH 8 imprägnieren und bei 120° 15 min trocknen) aufziehen. Servalyt mit TCA (Trichloressigsäure) auswaschen; Anfärbung mit 0.2% Coomassie Violet R 150-Lösung. Das gefärbte Papier mit dem Gel in Methanol-Wasser-Eisessig (33:66:10) auswaschen bis weiße Banden an den Stellen der Protease-Aktivität auf dunkelvioletten Untergrund erscheinen [17]. **Amylase.** Gel eine halbe Stunde in einer 1.5% Stärkelösung (in 0.4 M Phosphatpuffer pH 7.0) inkubieren. Gel mit Aqua dest. auswaschen und in eine Jod-Kalium-Jodidlösung legen bis das Gel durchgehend blau gefärbt ist. Weiße Banden erscheinen an den Stellen der Amylase-Aktivität [18]. **Cellulase.** Papier-Abklatsch nach der DIEF anfärben. Mit Whatman Papier Nr. 1, imprägniert mit 0.1 M Citratpuffer pH 5.0. Abklatsch herstellen und diesen bei 60° 15 min lang trocknen. Das Papier kurz in eine Lösung von 2 Volumenteilen Anilinphosphat und 3 Volumenteile Aceton legen und bei 120° 10 min lang trocknen. Auf gelblichen Untergrund treten dunkelbraune Banden an den Stellen der Cellulase-Aktivität auf [19]. **Polygalakturonase.** Papier-Abklatsch nach

Tabelle 1 Glycosidasen

|                 |                          |
|-----------------|--------------------------|
| α-Arabinosidase | : nicht nachweisbar      |
| β-Fucosidase    | : nicht nachweisbar      |
| α-Galaktosidase | : eine Enzym-Bande       |
| β-Galaktosidase | : sieben Isoenzym-Banden |
| α-Glucosidase   | : eine Enzym-Bande       |
| β-Glucosidase   | : sechs Isoenzym-Banden  |
| α-Mannosidase   | : nicht nachweisbar      |
| β-Xylosidase    | : vier Isoenzym-Banden   |

Gewonnen durch DIEF pH 2-11, Trägergel Bio Gel P-60 minus 400 mesh. Enzymnachweise: 4-methyl-umbelliferyl-Derivate der Enzym-Substrate, Fluoreszenz bei 366 nm betrachtet.

der DIEF anfärben. Vorher das Papier SS 2043 bMgl 5 min in einer 0.35% Pektinlösung in 0.1 M Citratpuffer pH 4.0 imprägnieren und lufttrocknen. Vorgang wiederholen. Mit diesem Papier Abklatsch herstellen und diesen bei 110° 10 min lang trocknen. Das Papier mit Aqua dest. auswaschen, dann mit Rutheniumrot anfärben. Den Papierstreifen mit Aqua dest entfärben bis an den Stellen der Polygalakturonase-Aktivität weiße Banden auf rosarotem Untergrund erscheinen [20, 21]. *Pektinesterase*. Papier-Abklatsch nach der DIEF anfärben mit Hydroxylammoniumchlorid/Eisenchlorid [22]. Densitogramme in Remission bei 524 nm im Spektrodensitometer Vitatron TLD 100 anfertigen. *Glycosidasen*. Papier-Abklatsch nach der DIEF anfärben. Dazu Whatman Papier Nr. 1 erst kurz vor dem Abklatsch mit dem frisch hergestellten Substrat imprägnieren. Substrat: jeweils 5 mg der 4-methyl-umbelliferyl-Derivate in 10 ml 0.1 M Citratpuffer pH 5 lösen. 4-methyl-umbelliferyl-: - $\alpha$ -D-arabino-, - $\beta$ -D-fuco-, - $\alpha$ (+)- $\beta$ -D-galacto-, - $\alpha$ (+)- $\beta$ -D-gluco-, - $\alpha$ -D-manno- und - $\beta$ -D-xylopyranosid. Abklatsch nach kurzer Kontaktzeit bei 60° trocknen. Die Fluoreszenz der Enzymbanden im UV bei 366 nm betrachten [19].

*Anmerkung*—Wir danken Herrn Priv. Doz. Dr B J Radola für wertvolle Hinweise.

#### LITERATUR

1. Drawert, F. und Krefft, M. (1978) *Lebensm.-Wiss. Technol.* im Druck.
2. Wadström, T. und Smyth, C. J. (1975) in *Progress in Isoelectric Focusing and Isotachopheresis* (Righetti, P. G. ed.) pp. 149–163. North-Holland, Amsterdam.
3. Radola, B. J. (1968) *J. Chromatogr.* **38**, 61.
4. Linskens, H. F. und Haage, P. (1963) *Phytopathol. Z.* **40**, 306.
5. Shishiyama, J., Araki, F. und Akai, S. (1970) *Plant Cell Physiol.* **11**, 937.
6. Urbanek, H. und Zalewska-Sobczak, J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **377**, 402.
7. van der Berg, L. und Yang, S. M. (1969) *Can. J. Botany* **47**, 1007.
8. Hancock, J. G., Millar, R. L. und Lorbeer, J. W. (1964) *Phytopathol.* **54**, 928.
9. Schroeder, C. (1972) *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **79**, 94.
10. Mount, M. S., Bateman, D. F. und Bashan, H. G. (1970) *Phytopathol.* **60**, 924.
11. McKeen, W. E. (1974) *Phytopathol.* **64**, 461.
12. Agrawal, G. P., Kulhara, D. und Bisen, P. S. (1974) *Biochem. Physiol. Pflanzen* **165**, 401.
13. Goodenough, P. W. und Maw, G. A. (1974) *Physiol. Plant Pathol.* **4**, 51.
14. Bateman, D. F. und Millar, R. L. (1966) *Ann. Rev. Phytopathol.* **4**, 119.
15. Radola, B. J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **295**, 412.
16. Winter, A., Perlmutter, H. und Davies, H. (1975) *LKB Application Note* **198**, 3.
17. Radola, B. J. (1975) in *Isoelectric Focusing* (Arbuthnott, J. P. und Beeley, J. A. eds) pp. 182–197. Butterworths, London.
18. Clausen, J. (1969) in *Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules* (Work, T. S. und Work, E. eds) *Laboratory Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules* Vol. 1, part III, pp. 538–539 North-Holland, Amsterdam.
19. Goerth, K. M. und Radola, B. J. unveröffentlichte Ergebnisse.
20. Lisker, N. und Retig, N. J. (1974) *J. Chromatogr.* **96**, 245.
21. Delincée, H., unveröffentlichte Ergebnisse.
22. Delincée, H. (1976) *Phytochemistry* **15**, 903.