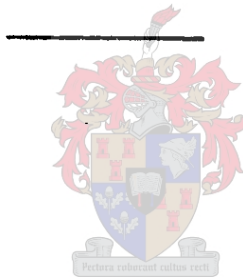


BIOCHEMIESE VERANDERINGE
IN DRUIWEMOS
VEROORSAAK DEUR
BOTRYTIS CINEREA EN RHIZOPUS NIGRICANS

deur

GERHARD HOFMANN



Skripsie goedgekeur ter verkryging van die graad
van MAGISTER IN DIE NATUURWETENSKAPPE IN LANDBOU
aan die Universiteit van Stellenbosch.

Stellenbosch.

November, 1964.

INHOUD

		<u>Bls.</u>	<u>No.</u>
<u>INLEIDING</u>			i
<u>HOOFSTUK I</u>	<u>MATERIALE EN TEGNIEKE</u>		1
1.1	MATERIALE		1
1.2	TEGNIEKE		2
1.2.1	Voorbereiding en inenting van mos		2
1.2.2	Bepalingsmetodes		4
1.2.2.1	Stikstof		4
1.2.2.2	Suikers		5
1.2.2.3	Gliserol		7
1.2.2.4	Organiese Sure		10
	(a) Vaste sure		10
	(b) Identifikasie van sure		14
	(c) Vlugtige sure		14
<u>HOOFSTUK II</u>	<u>RESULTATE EN BESPREKING</u>		17
2.1	GROEI EN ONTWIKKELING VAN DIE BOTRYTIS- EN RHIZOPUS-KULTURE OP DIE DRUIWEMOS		17
2.2	SUIKERS		20
2.3	STIKSTOF		23
2.4	GLISEROL		28
2.5	ORGANIESE SURE		33
2.5.1	Vaste sure		33
2.5.1.1	Glukoonsuur		33
2.5.1.2	Galakturoonsuur		36
2.5.1.3	Barnsteensuur en Glikolsuur		38
2.5.1.4	Appelsuur en Wynsteensuur		43
2.5.1.5	Sitroensuur		46
2.5.2	Vlugtige sure		48
<u>HOOFSTUK III</u>	<u>GEVOLGTREKKINGS</u>		51
<u>LITERATUURVERWYSINGS</u>			55

DANKBETUIGINGS

Hiermee wil ek graag my opregte dank betuig aan dr. J.A. van Zijl, onder-direkteur van die Navorsingsinstituut vir Wynbou en Wynbereiding, Stellenbosch, vir sy waardevolle leiding en hulp tydens die ondersoek en met die voorbereiding van hierdie skripsie.

Aan dr. I.S. Perold, professor in Landbou Biochemie aan die Universiteit van Stellenbosch, my opregte dank vir sy belangstelling, raad en hulp met die voorbereiding van die geskrif.

Ek is ook dank verskuldig aan mnr. G. le Roux van die N.I.W.W. vir die behartiging van die mikrobiologiese deel van die werk en die beskikbaarstelling van die swamkulture.

Aan mej. W. Barker van die N.I.W.W. my opregte dank vir die hulp verleen met die bepaling van sommige van die organiese sure.

My opregte dank aan mnr. F.H. Petri vir die voorbereiding van die grafieke en aan die onderskeie lede van die staf van die N.I.W.W. vir die hulp wat hulle op een of ander tyd verleen het.

Ten slotte wil ek ook die Departement van Landbou Tegnieke Dienste bedank vir die verlof om die resultate vir skripsiedoeleindes te gebruik.

G. Hofmann

STELLENBOSCH
November 1964.

INLEIDING

Botrytis cinerea Pers., of die "edelvrot" skimmel is reeds baie lank aan veral die Europese wynmakers sowel as fynproeërs van sekere Europese wyne bekend. Onder gunstige weersomstandighede verander, die skimmel die samestelling van wyndruiwe sodanig dat wyne van spesiale en hoë kwaliteit daaruit berei kan word. Voorbeelde van sulke wyne is die "Ausleseweine" van Duitsland en die Sautern-wyne van Frankryk.

Müller-Thurgau het reeds in 1888 'n intensiewe studie oor die sogenaamde "Edelfäule" (edelvrot) van druiwe gemaak. Hy het gevind dat die swam suiker sowel as suur afbreek. Die suurafname is relatief groter as die suikerafname, aangesien die sogenaamde veredeling van druiwesap by edelvrot te wyte is aan die verdamping, d.w.s. konsentrasie van die selsap van die druif. In absolute waardes bereken word daar egter meer as viermaal soveel suiker as suur verbruik. Stalder het in 1954 bewys dat die algemene aanname dat B.cinerea organiese sure bo koolhidrate as koolstofbron verkies, verkeerd is. Die swam is ook in staat om benewens glukose en fruktose ander koolhidrate af te breek.

Verder is dit ook bekend dat B.cinerea in 'n sintetiese voedingsmedium wynsteen-, appel- en sitroensuur afbreek, terwyl oksaalsuur onaangeraak bly (Behrens, 1898; du Plessis, 1936). Hierdie bevindinge is deur Peynaud, Lafourcade en Charpentier (1959) met proewe op druiwemos gestaaf.

Stalder (1954) het gevind dat wynsteensuur en appelsuur omtrent ewe geredelik afgebreek word. Die vorming van glukoon-suur (Rentschler en Tanner, 1955(a)) en sitroensuur (Ribéreau-Gayon, Peynaud, Lafourcade en Charpentié, 1955) uit glukose, en galakturoonsuur uit pektiene is waargeneem. Die navorsers het altyd groot hoeveelhede glukoon-suur in edelvrot druiwe aangetref, terwyl die suur in gesonde druiwe afwesig is. Ander sure wat deur die swam gevorm kan word is onder andere asynsuur (Ribéreau-Gayon, 1960), glukuroonsuur (Rentschler en Tanner, 1955(a)), slymsuur (Kielhöfer en Würdig, 1961) en selfs oksaalsuur (Gentile, 1954). Die vorming van oksaalsuur word egter deur sommige navorsers weerlê.

Die feit dat sommige navorsers sekere sure in Botrytis-mos gevind het, terwyl andere hulle aanwesigheid nie kon vasstel nie, kan moontlik aan die voorkoms van oneindig baie geneties verskillende stamme van B.cinerea gekoppel word (Stalder, 1954).

Die vorming van gliserol is 'n bekende eienskap van die swam (Nelson en Amerine, 1957; Dittrich, 1964), terwyl dit ook as koolstofvoedsel gebruik word. Die gliserol verbruik deur B.cinerea neem volgens Peynaud et al. (1959) af namate die pH van die mos toeneem.

Die stikstofinhoud van die druiwe waarop B.cinerea groei is ook van groot belang wat betref die mate van swam-groei (Ribereau-Gayon, 1960).

Uit die bogenoemde kan dus afgelei word dat die uitgebreide besmetting van wyndruiwe deur B.cinerea nie altyd as voordelig vir wynkwaliteit beskou kan word nie, maar dat dit ook groot verliese in druifkwaliteit kan meebring. Die sure en suikers van die druiwe word tot so 'n mate vernietig dat die wyne wat van sulke druiwe gemaak word van laagstaande kwaliteit is. In Suid-Afrika is die wyne oor die algemeen arm aan vrugtesure en die moontlikheid bestaan dat die besmetting van ons wyndruiwe deur B.cinerea altyd 'n kwaliteitsverlagende in plaas van 'n kwaliteitsbevorderende invloed op ons wyne sal hê.

Die doel van hierdie ondersoek was dus om 'n studie te maak van die biochemiese veranderinge wat sekere variante van B.cinerea, afkomstig uit Suid-Afrikaanse wingerde, in druiwemos veroorsaak. Aan die hand van hierdie informasie kan dan vasgestel word tot welke mate die betrokke skimmel of variante daarvan enige voordeel of nadeel vir die Suid-Afrikaanse wynbedryf inhou.

HOOFSTUK I

MATERIALE EN TEGNIEKE

1.1. MATERIALE

Dit is lank reeds bekend dat reinkulture van Botrytis cinerea 'n aansienlike mate van variasie kan ondergaan wat betref die tipe swamdraad, produksie van konidiospore, aanwesigheid, grootte en karakter van sklerotiums en ander eienskappe (Skinner, Emmons en Tsuchiya 1951; Stalder 1954; Hansen en Smith 1932). Om dus konstante kulture te verkry moes suiwer en konstante lyne van die swam verkry word.

Korrels van ryp druiwe waarop Botrytis-infeksie duidelik was, is oor die hele wynbouarea versamel, nl. uit die Stellenbosch-, Franschhoek-, Wellington-, Riebeeck-Wes-, Wolseley-, Tulbagh-, Montagu-, Bonnievale-, Robertson-, Worcester- en Villiersdorp-areas.

Vanaf hierdie korrels is spoorsuspensies gemaak en daaruit is enkelspoorisolasies met behulp van die mikromanipulator-tegniek gedoen. Kulture wat op hierdie wyse verkry is se variabiliteit is getoets met behulp van waarnemings op plate, assimilasie van spesifieke koolhidrate asook groeiwyse op verskillende media. Aangesien al hierdie kulture onstabiel was, is oorgegaan om plate herhaaldelik oor te ent totdat hulle homogene kultuureienskappe getoon het. Van hierdie plate is een enkelspoorkultuur gemaak waarvan weer herhaaldelik tien enkelspoorkulture gemaak is totdat al tien sulke kulture absoluut homogeen gebly het. Op hierdie manier is vanaf die ongeslagtelike fase van die swam (konidiospore) kulture verkry wat as geneties suiwer beskou kon word (Buxton, 1962).

Vier geneties konstante tipes van Botrytis cinerea wat die duidelikste kultuurverskille getoon het, nl. M3(iii)

65(iv), 10(iii) en 73(i) is vir die biochemiese werk uitgesoek. Hierdie kulture is deur die Centraalbureau voor Schimmelcultures te Baarn in Holland bevestigend as rasse van Botrytis cinerea Persoon geïdentifiseer.

Die kulture het op mos-agar plate die volgende eienskappe getoon: Ras 65(iv) het 'n digte swamdraadmat en baie konidiospore gevorm. Die kleur van die kultuur was aansienlik donkerder as die gewone vaalgrys wat kenmerkend van Botrytis cinerea is (Jørgensen, 1956). Sklerotiums was baie klein en min. Ras 73(i) was nie so 'n aktiewe groeier as ras 65(iv) nie en het baie minder konidiospore, maar meer en groter sklerotiums gevorm. Die kleur van die kultuur was kenmerkend vaalgrys. Ras 10(iii) was weer 'n sterker groeier as 73(i). Die kultuur het 'n vaalgrys kleur gehad, maar in die medium is 'n rooi kleurstof gevorm. Dit was netsoos ras 65(iv), 'n sterk spoorvormer, en het 'n redelike hoeveelheid sklerotiums gevorm. Ras M3(iii) het in feitlik alle opsigte van die ander drie kulture verskil. Die swamdraad was spierwit van kleur en dit was 'n redelike sterk groeier, alhoewel aanvanklik stadig. Geen konidiospore en sklerotiums, maar wel spermatiums is gevorm (Schanderl, 1959).

Die eksperimentele mos is in die 1961 seisoen van gesonde, ryp Steendruie gepars. 'n Konvensionele parsmasjien is gebruik en die mos is met die doppe in 10 liter glasflesse opgevang en gevries. Geen SO₂ is op die druie gebruik nie.

1.2. TEGNIEKE

1.2.1. Voorbereiding en inenting van mos

Nadat die mos 'n geruime tyd in bevrore toestand bewaar is, is dit ontdooi en met 'n growwe filter gefiltreer om doppe, pitte en ander growwe dele te verwyder. Die wynsteensuur, wat met bevriësing tot 'n geringe mate uitgekristalliseer het,

is nie weer opgelos nie, omdat die meeste tydens die duur van die ontledings in bevrore toestand bewaar moes word en 'n kristallisering van wynsteensuur in hierdie stadium ongewens sou wees. Vervolgens is die mos met 'n K₅-filter gefiltreer om die fyner troebeling te verwyder, met 'n E.K.-filter gesteriliseer en 500 ml asepties in 1 liter reagensflesse gevul. Die reagensflesse is vooraf in 'n outoklaaf vir 15 minute by 15 lb. stoomdruk gesteriliseer (Burroughs, 1957). Verder is voldoende hoeveelhede van hierdie gesteriliseerde mos gehou vir kontrole-ontledings van mos waarop die skimmels nie gegroei het nie.

Die genoemde rasse van B.cinerea is elk in sesvoud op die mos in die reagensflesse ingeënt. Die steriele swamdraad-tipe, ras M3(iii), is met 'n stukkie van die swamdraad ingeënt, terwyl die ander drie met konidiospore ingeënt is.

Rhizopus nigricans is as vergelykende organisme geneem aangesien die swam met 'n hoë frekwensie saam met B.cinerea op druiwe voorkom. Hierdie swam is dan ook in sesvoud soos die rasse van B.cinerea op die mos ingeënt.

Die reagensflesse is in 'n broeikas met 'n glasdeur by 25°C gelaat en van tyd tot tyd rekord gehou van die mate van groei van die swamme op die mos. Na 'n groeitydperk van 2 maande is die swamgroei by drie flesse van elke kultuurreeks gestaak, terwyl groei by die orige drie flesse van elke reeks na 4 maande gestaak is. Dit is gedoen deur die mos tesame met die swamgroei in 'n homogeniseerder vir 5 minute te behandel en daarna te sentrifugeer vir 20 minute by 3800 o.p.m.. Die helder vloeistof wat so verkry is, is dan weer met gedistilleerde water tot die oorspronklike volume van 500 ml aangevul aangesien die volume as gevolg van verdamping tydens die groeitydperk afgeneem het. Die monsters is in 'n bevrore toestand bewaar totdat die ontledings daarop gedoen is.

1.2.2. Bepalingsmetodes:

1.2.2.1. Stikstof

Die stikstofbepalings op die mos is uitgevoer nog voordat enige proteïene as gevolg van bevriesing kon koaguleer. Gewysigde metodes vir die bepaling van verskillende stikstof-fraksies, soos beskryf deur Burroughs (1957), is aangewend.

Die totale stikstofgehalte van die eksperimentele moste is met behulp van die mikro-Kjeldahl-metode bepaal (Linstead, Elvidge en Whalley 1955).

160 ml Etielalkohol (96%) is by 40 ml mos gevoeg en goed geroer. Nadat dit oornag gestaan het, is die gevormde neerslag met 'n "sintered glass" filter (porosity No.4) afgefiltreer. Hierdie behandeling het pektiene en 'n hoeveelheid stikstof, wat as proteïen-stikstof en hoër peptiede beskou is, verwyder. Die neerslag op die filter is met 10 ml 80% etielalkohol gewas en die filtraat is tesame met die wasalkohol kwantitatief in 'n 250 ml volumetriese fles oorgespoel en met 80% etielalkohol tot by die merk opgevul.

Vervolgens is 100 ml van die alkoholiese oplossing, ekwivalent aan 16 ml mos, met 5 ml 2N H_2SO_4 aangesuur en in 'n vakuuomond by 25°C gekonsentreer. Die swawelsuur bind vry ammoniak wat in die filtraat aanwesig mag wees. Die gekonsentreerde oplossing (\pm 15 ml) is kwantitatief in 'n 25 ml volumetriese fles oorgespoel en met gedistilleerde water tot volume gebring. 'n Geskikte monster van hierdie oplossing is in duplikaat volgens die mikro-Kjeldahl-metode verteer en die stikstofgehalte daarin bepaal.

Die orige 150 ml van die 250 ml alkoholiese filtraat is kwantitatief deur 'n kolom van Dowex 50 W x 4 (100-200 maas)

kunshars, in die H^+ vorm, teen 'n vloeispoed van ongeveer 30 ml per uur gestuur. Die deursnee van die kolom was 1.1 cm en die lengte 15 cm. Nadat die alkoholiese oplossing deur die kolom gestuur is, is die kolom met 25 ml gedistilleerde water gewas om alle nie-geadsorbeerde stowwe daaruit te verwyder. Die oplossing saam met die waswater is weer soos voorheen onder vakuum gekonsentreer, kwantitatief opgevol na 25 ml, 'n monster in duplikaat verteer en die stikstofgehalte bepaal (mikro-Kjeldahl).

Die verskil tussen die stikstofgehalte van die oplossing voor- en nadat dit deur die kolom gestuur is, gee die hoeveelheid stikstof aan wat deur die kolom geadsorbeer en as aminostikstof beskou kan word. Die stikstofgehalte van die oplossing nadat dit deur die kolom geloop het, is beskou as restikstof. Die verskil tussen die totale stikstofgehalte en die stikstofgehalte van die mos wat met alkohol behandel was, dui die hoeveelheid stikstof aan wat as proteïenstikstof deur die alkohol neergeslaan is.

Bostaande prosedure is in duplikaat op die suiwer mos, die Botrytis- en Rhizopus-moste deurgevoer.

Vry ammoniak-stikstof is in afsonderlike 5 ml hoeveelhede van elke eksperimentele mos, na behandeling met voldoende \pm 30% NaOH oplossing (tot alkalies), volgens die mikro-Kjeldahl-metode gedistilleer en bepaal.

1.2.2.2. Suikers

Die metode vir die bepaling van totale reduserende suikers berus op die reduksie van 'n alkaliese oplossing van kopersulfaat, gestabiliseer deur tartraat. Die kopersulfaat word in sy gereduseerde vorm as kuproöksied neergeslaan. Laas-

genoemde is eweredig aan die hoeveelheid reduserende suiker teenwoordig (Somogyi, 1945). Die Kuproöksied is vervolgens met arsenomolibdaatreagens behandel en die gevormde molibdeenblou kolorimetries bepaal (Nelson, 1944).

Die suikergehalte van die moste is in duplikaat direk en op 'n voorafbehandelde monster bepaal.

Vir die voorafbehandeling is 5 ml mos met 'n mespunt aktiewe plantkool, Norit A, gemeng en na 'n tydjie gesentrifugeer. Die helder oplossing is gedekanteer en die koolstof in die sentrifugeerbuis weer met 5 ml gedistilleerde water omgeroer en gesentrifugeer. Die wasproses is drie maal herhaal en die mos saam met die waswater kwantitatief deur kolomme van Amberlite IR - 4 B (OH^-) en Amberlite IRC - 50(H^+), in serie geskakel, gestuur. Die deursnee van die kolomme was 1 cm en lengte 10 cm en 'n vloeispoed van 30 ml per uur is gehandhaaf. Daarna is die kolomme met 50 ml gedistilleerde water gewas en die eluaat saam met die waswater kwantitatief in 'n 200 ml volumetriese fles oorgespoel. Van hierdie oplossing is dan 'n geskikte verdunning gemaak vir die bepaling van reduserende suikers volgens Neish (1952).

Die funksie van die plantkool is om van fenoliese bestanddele en kleurstowwe in die mos ontslae te raak (Partridge, 1949), terwyl die Amberlite kunsharse ander reduserende stowwe, soos organiese sure (b.v. galakturoonsuur), amiene, amiede en aminosure uit die mos verwyder. Indien sterker adsorbeerders as bogenoemde twee Amberlite-tipes gebruik word, kan die suikers 'n keto-enol isomerie ondergaan, of selfs geoksideer word en sal dan nie kwantitatief uit die kolomme herwin kan word nie (Hulme, 1953).

Vir die kwalitatiewe bepaling van die verskillende heksoses en pentoses wat in die meeste aanwesig mag wees, is 10 ml van elke mos in 'n Einhorn-buis met di-etiel-pirokool-suurester gesteriliseer (van Zyl, 1962). Een reeks is met 0.5 ml van 'n kultuur van die gis Saccharomyces acidifaciens ingeënt en die ander reeks met Saccharomyces veronae. Eersgenoemde gis besit die eienskap om slegs glukose en fruktose te gis en soms galaktose te assimileer, terwyl laasgenoemde glukose, maltose, sukrose en raffinose gis. Op hierdie wyse is gepoog om van die groot oormaat glukose en fruktose in die meeste ontslae te raak sodat die oorblywende heksoses en pentoses papierchromatografies geïdentifiseer kon word (Colombo, Corbetta, Pirotta, Ruffini en Sartori, 1960 en Kocková-Kratochvilová en Vojtkoválepšiková, 1958).

Ten einde 'n aanduiding te kry van die invloed wat Botrytis-groei op die gisting van 'n mos het, is 50 ml van elke mos soos voorheen met di-etiel-pirokoolsuurester behandel en met die gis Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus ingeënt. Gissnelheid is met behulp van daaglikse gewigsverlies bepaal.

1.2.2.3. Gliserol

Gliserol in die mos is volgens die prosedure van Neish (1950, 1952) op 'n Celite 535 kolom geskei en daarna deur middel van perjodaatoksidasie kolorimetries bepaal (Lambert en Neish, 1950).

Drie gram droë Celite is met 2 ml water benat en deeglik met behulp van 'n glasstaaf gemeng. Vervolgens is dit met ongeveer 20 ml van 'n waterversadigde etielasetaatoplossing (5 etielasetaat : 1 water v/v) omgeroer en in die glasbuis (deursnee 14 mm) oorgespoel. Die inhoud van die buis is met behulp van 'n geskikte papierskyfie (2 mm dik) vasgedruk. Daarna

is 0.5 g droë Celite op dieselfde wyse in die buis oorgebring en ook met behulp van 'n papierskyfie vasgedruk. Die bostaande etielasetaat is gedekanteer en die monster mos (0.5 ml) direk op die boonste papierskyfie oorgebring sonder om die kante van die glasbuis te raak. Die monster is met 2-3 ml waterversadigde etielasetaat ingespoel. Die kolom is agtereenvolgens geëlueer met 5l ml waterversadigde etielasetaat en 95 ml waterversadigde butanol-benseenmengsel (3 butanol : 1 benseen : 1 water v/v). Die laaste 60 ml wat opgevang word, is die fraksie waarin gliserol voorkom.

Aangesien die gliserolgehaltes van sommige van die eksperimentele moste baie laag was, is in plaas van 0.5 g droë Celite 1.0 g gebruik. Gevolglik is ook 1 ml monster van die moste op die kolom oorgedra. In hierdie geval is agtereenvolgens met 5l ml waterversadigde etielasetaat en 90 ml waterversadigde butanol-benseenmengsel geëlueer. Dit is gevind dat al die gliserol in die laaste 70 ml aanwesig was.

Herwinningstoetse is uitgevoer met gliserolstandaarde waarvan die konsentrasie tussen 2.5 mg/l en 5 mg/l gewissel het. Herwinste van 97-98% is verkry, wat ooreenstem met die herwinste verkry op die standaard kolom soos beskryf deur Neish (1952).

Dit is gevind dat sekere van die eksperimentele moste buitengewoon hoë gliserolwaardes getoon het. Dit het die vermoede laat ontstaan dat dihidroksiasetoon en/of gliseraldehied saam met die gliserolfraksie uit die skeidingskolom elueer. Aangesien hierdie twee verbindings, net soos gliserol, deur perjodaat geoksideer word, word hulle verkeerdelik as gliserol bepaal. Om hierdie moontlike fout uit te skakel is standarde van dihidroksiasetoon, bevattende 2-2.5 mg/0.5 ml oplossing en asetaldehied, bevattende 1-2 mg/0.5 ml oplossing, op die

- 9 -

skeidingskolom oorgedra en die elueerprosedure deurgevoer soos beskryf.

Dit is gevind dat gliseraldehid voor die begin en saam met die gliserolfraksie sowel as daarna uit die kolom elueer. Die hoeveelhede was soos volg:

	20 ml eluaat voor gliserol- fraksie	Gliserol- fraksie	25 ml eluaat na gliserol- fraksie
Gliseraldehid	9.5%	42.8%	24.9%

Herwins: 77.2%

Dihidroksiaseeton is voor en saam met die gliserolfraksie geëluëer. Die hoeveelhede in hierdie geval was soos volg:

	40 ml eluaat voor gliserol- fraksie	Gliserolfraksie
Dihidroksiase- toon	38%	23%

Herwins: 61%

Aangesien beide hierdie verbindings reduserend is, is hulle met behulp van die Somogyi koperreagens bepaal soos beskryf vir reduserende suikers.

Vervolgens is ook 'n 0.5 ml monster van 'n oplossing bevattende 1 g glukose en 1 g fruktose per 100 ml oplossing deur die kolom gestuur om die posisie waar die suikers elueer, te bepaal. Dit is gevind dat suikers eers lank na die gliserol-fraksie geëlueer word. Suikers kon dus nie die gliseroloksidase beïnvloed nie.

1.2.2.4. Organiese Sure

(a) Vaste sure

Die vaste organiese sure is kwantitatief volgens 'n gewysigde metode van Hulme en Wooltorton (1958) op 'n Dowex ioon-uitruilkolom bepaal. Voordat die sure in die moste egter kwantitatief geskei kon word, is 'n voorafbehandeling op die mos uitgevoer. Die doel van hierdie behandeling was om die suikers en ander stowwe van die suurfraksie te skei, aangesien aromatiese verbindings onder andere die kunshars kon kontamineer en die skeiding dus nadelig kon beïnvloed. Om tyd en materiaal te bespaar is die triplikate van elke kultuurreeks van die vier Botrytis- en die Rhizopus-moste in gelyke hoeveelhede gemeng en die bepalinge op die mengsels uitgevoer. In die meeste gevalle **was** slegs twee van die oorspronklike drie moste van elke kultuurreeks nog beskikbaar aangesien gekontamineerde moste verwyder is.

75 ml Van hierdie verteenwoordigende mengsel is in duplikaat met 75 ml gedistilleerde water gemeng en deur kolomme van Dowex 50W x 4 in die H^+ vorm (100-200 maas) en Dowex 1 x 8 in die asetaat vorm (100-200 maas) gestuur teen 'n vloei-spoed van 30 ml per uur. Die kolomme is in die volgorde soos hierbo genoem in serie geskakel en het 'n deursnee van 1.3 cm en 'n lengte van 16 cm gehad.

Nadat die verdunde mos deur die kolomme gestuur is, is 80 ml gedistilleerde water deurgewas om suikers en ander nie-geadsorbeerde stowwe te verwyder. Die Dowex 50 W kolom het gedien om aminosure te adsorbeer terwyl die Dowex 1 x 8 kolom die organiese sure en ongewenste aromatiiese verbindings geadsorbeer het. Die ongewenste aromatiiese verbindings is op Dowex 1 x 8 geadsorbeer om te voorkom dat hulle 'n nadelige uitwerking op die hars van die skeidingskolom uitoefen. Geadsorbeerde sure is vervolgens uit die Dowex 1 x 8 kolom met 80 ml 6 N miersuur geëluëer. Die eluaat is in 'n plat porseleinbakkie met behulp van 'n warm lugstroom in 'n oond by 40°C drooggedamp. Voordat die bakkie uit die oond verwyder is, is die temperatuur vir 10 minute tot 48^o-50^oC verhoog om alle spore van miersuur te verdryf. Die organiese sure is in CO₂-vrye gedistilleerde water opgelos en kwantitatief in 'n 200 ml volumetriese fles oorgespoel. Twintig ml van hierdie oplossing is teen 0.1 N NaOH oplossing getitreer en die totale suur as wynsteensuur bereken. Van hierdie oplossing is 'n volume, wat ongeveer 200 mg suur (as wynsteensuur) bevat, deur die Dowex 1 x 8 skeidingskolom (Ac⁻vorm, 200-400 maas) gestuur. Die kolom is aan 'n mengbuis gevul met gedistilleerde water gekoppel, soos deur Hulme en Wooltorton (1958) beskryf.

Die elueerproses is met 100 ml 3 N asynsuur begin en opgevolg deur 170 ml 6 N asynsuur. Aanvanklik is teen 'n vloeispoed van ongeveer 25 ml per uur geëluëer. Dit is bewerkstellig deur die toediening van 'n bepaalde druk op die kolom en mengbuis. Fraksies van ongeveer 3 ml elk is met behulp van 'n fraksieversamelaar opgevang. Na fraksie 50 is die druk op die kolom verhoog ten einde 'n vloeispoed van 30 tot 35 ml per uur te bereik. Sodra 90 fraksies versamel is, is die kolom van die mengbuis verwyder en verder direk met 80 ml 6 N miersuur deur gravitasie geëluëer om wynsteensuur en sitroensuur te verplaas.

Die individuele fraksies uit die versamelaar is kwantitatief in 50 ml bekere oorgebring en soos voorheen beskryf in 'n oond drooggedamp. Dit is gevind dat fraksies 55-85 al die appelsuur bevat. Hierdie fraksies is derhalwe saamgevoeg, in 'n porseleinbakkie drooggedamp, in CO₂-vrye gedistilleerde water opgelos, kwantitatief in 'n 100 ml volumetriese fles oorgespoel en tot die merk opgevol.

Al die sure is teen 0.01 N NaOH onder 'n stikstof-atmosfeer (fenolftaleïen indikator) getitreer en die titrasiesyfers grafies teenoor die fraksienommers voorgestel. Van die totale titrasiewaardes van elke piek kan, na identifikasie en aftrek van die blankowaarde, die hoeveelheid van elke suur bereken word.

Die eluaat wat die wynsteensuur- en sitroensuurfraksies bevat het, is ook ingedamp en met CO₂-vrye gedistilleerde water kwantitatief in 'n 50 ml volumetriese fles oorgespoel. Op duplikaatmonsters van 20 ml elk van hierdie oplossing is 'n wynsteensuurbepaling uitgevoer volgens Amerine (1955). Die bepaling berus op die neerslaan van die wynsteensuur as kaliumwaterstoftartraat. Die totale aantal gramekwivalente suur in die 50 ml oplossing is op die oorblywende oplossing deur titrasie teen 0.01 N NaOH bepaal. Die reeds bepaalde hoeveelheid gramekwivalente wynsteensuur is dan van hierdie waarde afgetrek en die verskil uitgedruk as sitroensuur.

Bostaande kolomskeidings en bepalings op die eluate is in duplikaat op elke eksperimentele mos uitgevoer.

Om die herwins van die verskillende sure deur die skeidingskolom te bepaal, is 'n standaardoplossing van geïdentifiseerde sure in die meeste gemaak en die skeiding deurgevoer soos reeds beskryf.

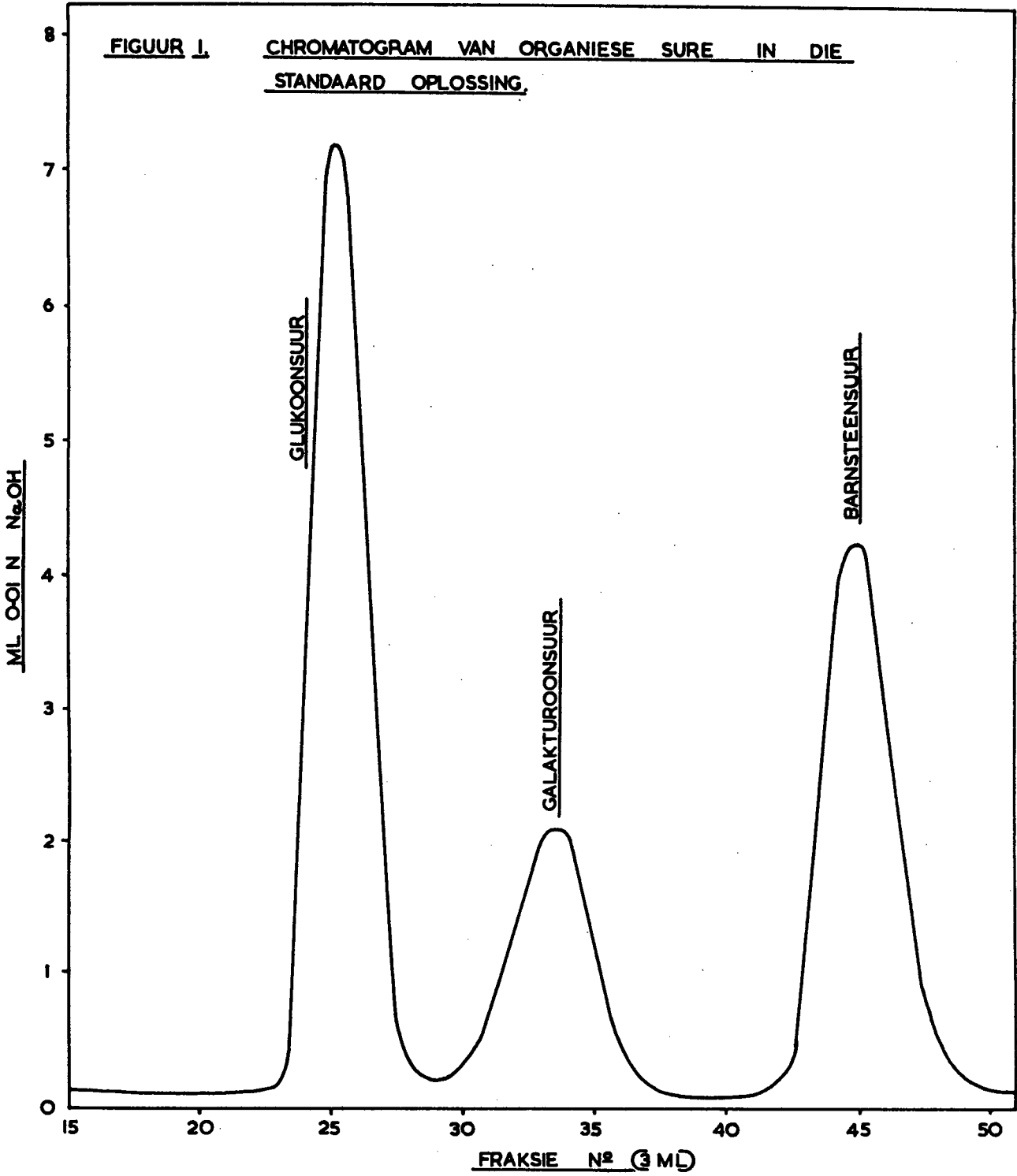
Die herwinste vir elke afsonderlike suur was :
 glukoon suur 76.5%, galakturoon suur 103.7%, barnsteensuur 99.4%,
 appelsuur 104.6%, wynsteensuur 115%, sitroensuur 86.9%.
 Figuur 1 is 'n grafiese voorstelling van die skeiding van eers-
 genoemde drie sure. Glikol suur is nie weer herwin nie (sien
 2.5.1.3.).

Vir die bepaling van barnsteen- en glikol suur is die
 gesamentlike fraksies voorberei soos onder die identifikasie
 van sure uiteengesit. Dieselfde silikagelkolom en prosedure
 soos by die bepaling van vlugtige sure (1.2.2.4. c) is gebruik.
 Sodra die mieresuurfraksie geëlueer is, is die volgende elu-
 eringspatroon verder deurgevoer:

<u>Suur</u>	<u>Oplosmiddel</u>	<u>Volume eluaat(ml)</u>
Melksuur	CHCl_3 : Butanol : 0.01N HCl(9:1:2 v/v)	50
Barnsteen- suur	CHCl_3 : Butanol : 0.01N HCl(9:1:2 v/v)	70
Glikol suur	CHCl_3 : Butanol : 0.01N HCl(4:1:1v/v)	70

Toetse met suiwer oplossings van barnsteen- en gli-
 kol suur het bewys dat die eluering van barnsteensuur deur die
 aanwesigheid van glikol suur vertraag word. Derhalwe word
 70 ml eluaat opgevang. Die herwinste van die twee sure op die
 kolom was 98-100%.

Om die konsentrasies barnsteen- en glikol suur af-
 sonderlik te bereken is die totale titrasiesyfer van die twee
 sure na skeiding op die Dowex-kolom verdeel in die verhouding
 waarin hulle op die silikagelkolom geskei is. Die konsentra-
 sies is in elke geval as ml 0.01 N NaOH uitgedruk en omgewerk
 na die ooreenstemmende gewig suur.



(b) Identifikasie van sure

Vir die identifikasie van die verskillende sure is die getitreerde fraksies van elke afsonderlike suur bymekaar-gevoeg, met Dowex 50 W x 8 (H^+) opgeskud en gefiltreer. Die hars op die filter is met gedistilleerde water gewas. Die filtraat tesame met die waswater is soos voorheen genoem in 'n oond ingedamp tot ongeveer 2-3 ml. Hierdie konsentrate bevat die betrokke sure weer in die vry vorm en is gebruik vir die identifikasie van die sure. Konsentrate wat barnsteensuur en glikolsuur (diglikolsuur ?) bevat het, is kwantitatief na 'n geskikte volume opgevol (5 of 10 ml) en genoeg HCl bygevoeg om die oplossing ongeveer 0.01 N te maak. Dit was noodsaaklik aangesien die barnsteensuur-glikol-suurmengsel op 'n silikagelkolom oorgedra en die konsentrasie van elk bepaal is.

Die werklike identifikasie van die organiese sure in die konsentrate is papierchromatografies en elektroforeties deurgevoer. In die geval van die papierchromatografie is 'n mengsel van n-pentanol en 5 M miersuur (1:1v/v) as elueermiddel gebruik (Buch, Montgomery en Porter, 1952). Vir die elektroforetiese skeidings is $(NH_4)_2 CO_3$ by pH 8.9 as elektroliet gebruik, terwyl 'n spanning van 50 V/cm vir 50 minute by 'n buffertemperatuur van $-3^{\circ}C$ volgehou is. Whatman 3MM papier is gebruik. Nadat die buffer van die papier in 'n oond by $85^{\circ}C$ vir 15 minute afgedryf is, is laasgenoemde met 'n mengsel van fluoressien-Na en $AgNO_3$ bespuit soos beskryf deur Polard, Nickless en Burton (1962). Die sure op die sferogram toon onder U.V.-lig geel fluoresserende kolle teen 'n rooi agtergrond.

(c) Vlugtige sure

50 ml Mos is in 'n distilleerfles gepipetteer
1 ml 10 N H_2SO_4 en 17-18 g $MgSO_4$ -kristalle bygevoeg en stoom-

gedistilleer (Olmsted, Whitaker en Duden, 1929). Nadat ongeveer 250 ml oorgestook is, is die distillaat met 0.1 N NaOH getitreer tot by die fenolrooi endpoint. Die totale vlugtige sure is bereken (as asynsuur) en die geneutraliseerde distillaat op 'n stoombad drooggedamp. Die oorblywende Na-soute is in 'n desikkator oornag gedroog en vir die bepaling van die individuele sure gebruik soos beskryf deur Neish (1952).

Ses gram silikagel (Ramsey en Patterson) is met 2.7 ml 0.01 N HCl goed gemeng, omgeroer in ongeveer 20 ml van 'n 0.01 N HCl versadigde chloroform oplossing (5 chloroform:1 0.01 N HCl v/v) en in 'n kolom met 'n deursnee van 1.4 cm gepak (Neish, 1952). Die prosedure vir die pak van die kolom is identies met die beskryf vir die kolomskeiding van gliserol (1.2.2.3.). 'n 0.6 g Monster droë silikagel is vir die adsorpsie van die mengsel van sure gebruik. Behandeling van die Na-soute en oordraging van 'n 0.5 ml monster op die kolom is volgens die voorskrifte van Neish deurgevoer.

By die eluering van die kolom is nie van 'n indikatorstroom gebruik gemaak nie. In plaas daarvan is elke maatsilinder, waarin die eluaat opgevang is, van 1 ml fenolrooi indikatoroplossing voorsien. Aangesien die indikator bo-op die elueermiddel in die maatsilinder dryf, kon die omslagpunt dadelik waargeneem word. Die kolom is agtereenvolgens met chloroform en verskillende mengsels van chloroform en butanol geëlueer (Bulen, Varner en Burrell, 1952). Die elueermiddels is vooraf met 0.01 N HCl versadig. Die verhoudings chloroform : butanol : 0.01 N HCl en die volume eluaat waarin elke suur geëlueer is, was soos volg:

Frak- sie	Suur	Elueermiddel	Volume eluaat(ml)
1	Bottersuur	CHCl_3 : 0.01N HCl (5:1 v/v)	19
2	Propioonsuur	CHCl_3 : 0.01N HCl (5:1 v/v)	24
3	Asynsuur	CHCl_3 :Butanol:0.01N HCl(19:1:4v/v)	30
4	Mieresuur	CHCl_3 :Butanol:0.01N HCl(19:1:4v/v)	50

Die hoeveelheid suur in elke fraksie is bepaal deur titrasie teen 0.01 N NaOH onder 'n stikstofatmosfeer (Neish, 1952). Die stoomdistillasie sowel as die kolomskeidings op elke distillaat is in duplikaat op die mengsels van elke kultuurreeks (sien 1.2.2.4.) uitgevoer.

HOOFSTUK II

RESULTATE EN BESPREKING

2.1. Groei en ontwikkeling van die Botrytis- en Rhizopus-kulture op die druiwemos

Ras 65(iv) het drie dae na inenting op die mos in al ses proefflesse dieselfde mate van groei getoon. Die swamdraadmat het rondom die rand van die flesse, met enkele eilande ($\emptyset \frac{1}{2}$ -1 cm) in die middel, gegroei. Een van die ses flesse was gekontamineer en is verwyder. Na 'n groeitydperk van een week het 'n eweredige dik swamdraadmat in elke fles gevorm, met digte spoormassas op plekke. Na drie weke was die swamdraadmat reeds ongeveer 1 cm dik. Die digte spooroppervlakte op die swamdraadmat het vanaf die rande en op plekke in die middel weer met nuwe swamdrade begin toegroei. Aan die rand en onder die mat het 'n aaneenlopende laag sklerotiums gevorm, terwyl 'n wollerigheid op die bodem van die flesse ontstaan het. Die medium was verder nog helder. Een fles het op hierdie stadium gekontamineer geraak en is verwyder. Na 'n groeitydperk van vyf weke het groot massas sklerotiums onder die swamdraadmat gevorm, terwyl die wollerigheid onder in die flesse toegeneem het. Die swamdraadoppervlakte was kenmerkend donker vaalgrys van kleur.

Netsoos ras 65(iv) het ras 10(iii) drie dae na inenting ook in elk van die flesse dieselfde mate van groei getoon. 'n Dun swamdraadmat wat op plekke nog effens deurskynend was, het oor die oppervlakte van die mos in elke fles gevorm. Reeds op hierdie vroeë stadium het die rooi kleurstof wat kenmerkend van hierdie ras is, begin ontstaan.

Na verloop van een week het die ras 'n gevoude swamdraadoppervlakte met 'n aaneenlopende, digte, gladde laag spore gevorm, terwyl die rooi kleurstof verder toegeneem het. Na drie weke het die oppervlakte van die swamdrade 'n gevoude voorkoms met 'n dik laag spore gehad. Die swamdraadmat was ongeveer 1 cm dik en die laag spore was op plekke weer met nuwe swamdrade toegegroeï. Die rooi kleurstof het veral aan die onderkant van die mat baie prominent geword. Aan die rand en onder die swamdraadmat het 'n aaneenlopende laag sklerotiums gevorm, terwyl 'n effense korrelrigheid op die bodem van die fles ontstaan het. Die medium, dws. die mos, was verder nog helder. Net soos in die geval van ras 65(iv) het groot massas sklerotiums onder die swamdraadmat na vyf weke begin vorm, terwyl 'n wollerigheid op die bodem van die flesse ontstaan het. Die swamdrade was vaalgrys van kleur.

Ras 73(i) het na 'n groeitydperk van drie dae dieselfde voorkoms as ras 65(iv) gehad. Een fles was gekontamineer en is derhalwe verwyder. Na een week het 'n eweredige digte mat op die oppervlakte van die mos in elke fles gevorm, terwyl spore in die middel en plek-plek op die rand voorgekom het. Na drie weke was die dik bultagtige spoormat op plekke reeds met nuwe swamdrade toegegroeï en 'n aaneenlopende laag sklerotiums het rondom aan die rand van die swamdraadmat gevorm. Aan die onderkant van die mat was min sklerotiums aanwesig, terwyl 'n wollerigheid deur die hele medium (mos) en veral op die bodem van die flesse ontstaan het. Na vyf weke het onder die swamdraadmat groot massas sklerotiums gevorm en die wollerigheid het verder toegeneem. Die swamdrade was wit tot vaalgrys van kleur.

Ras M3(iii) het na drie dae nog geen tekens van groei getoon nie. Die stukkies swamdraad waarmee die mos ingeënt is, het daarin afgesak en as gevolg van suurstofgebrek nie gegroeï

nie. Na een week was daar nog steeds geen tekens van groei nie, en die mos moes met vars swamdrade heringeënt word. Veertien dae na herinenting het 'n swamdraadmat van ongeveer 2 cm breed aan die rand van die mos in sommige van die flesse gevorm, terwyl by die res 'n mat in die middel (eiland) ontstaan het. Die swam het egter in al die flesse dieselfde mate van groei getoon. Onder die oppervlakte van die swamdraadmat het 'n wollerigheid ontstaan wat by die ander rasse eers drie weke na inenting, en wel op die bodem van die flesse, ontstaan het. Slegs een fles het na herinenting geen groei getoon nie en is verwyder. Vier weke na herinenting het die wollerigheid in die medium sterk toegeneem en die swamdraadmat het oor die hele mosoppervlakte versprei met enkele dun plekke tussenin. Soos verwag het geen spore gevorm nie. In teenstelling met die ander rasse, wat hoofsaaklik op die oppervlakte van die mos gegroei het, het ras M3(iii) veral onder die oppervlakte ontwikkel.

Rhizopus nigricans het na drie dae reeds die oppervlakte van die mos met 'n dun swamdraadmat bedek en 'n dun laag spore gevorm. Na een week het groot hoeveelhede spore gevorm en net soos ras M3(iii) het die swam onder die oppervlakte 'n digte wollerigheid gevorm wat mettertyd al dieper in die medium ingedring het.

Oor die algemeen kan gesê word dat die vier rasse van B. cinerea op mos nie gevarieer het wat betref hulle kenmerkende kleur-, spoor- en sklerotiumvorming nie. Ras M3(iii) het aanvanklik baie stadiger gegroei en dieper in die medium ingedring as die ander drie. By rasse 65(iv), 73(i) en 10(iii) het groei slegs op die oppervlakte plaasgevind en die wollerigheid in die medium is eers na 'n groeitydperk van twee tot drie weke waargeneem. Die mate van groei in elk van die flesse met die vier Botrytis-rasse sowel as in die Rhizopus-flesse was oor die algemeen baie dieselfde.

Die groei het by alle kulture, behalwe by ras M3(iii) en Rhizopus, na 'n tydperk van ongeveer nege weke opgehou. Die genoemde twee swamme darenteen het vir die volle tydperk van vier maande aangehou groei, alhoewel die groeitempo geleidelik afgeneem het.

2.2. Suikers

Tabel 1 toon dat die suikerwaardes by alle moste waarop Botrytis, uitgesonderd ras M3(iii), vir twee maande gegroei het, sterk afgeneem het. Ras M3(iii) is die uitsondering omdat hierdie ras aanvanklik swakker gegroei het. Na 'n groeitydperk van vier maande het die suikergehalte van die moste nog verder gedaal. By die moste waarop Rhizopus gegroei het, was die afname in suikergehalte heelwat geringer, veral na vier maande van groei. Slegs 70% van die suiker is deur Rhizopus gedissimileer, terwyl die Botrytis-rasse 65(iv), 10(iii) en 73(i) ongeveer 90% afnames getoon het.

TABEL 1 Totale reduserende suikergehalte van kontrole-, Botrytis- en Rhizopusmoste en persentasie afnames nadat die swamme vir 2 en 4 maande op die mos gegroei het

Monster	Suikergehalte g/l		Afname %	
	(a)	(b)	(a)	(b)
Kontrole-mos	203			
M3(iii)	179.00	99.50	11.8	51.0
65(iv)	75.62	13.75	62.7	93.2
10(iii)	84.50	27.10	58.4	86.7
73(i)	88.50	17.63	56.4	91.3
<u>Rhizopus</u>	95.00	60.00	53.2	70.4

(a) 2 maande kultuur (b) 4 maande kultuur

Die koolhidrate in mos bestaan hoofsaaklik uit glukose en fruktose, terwyl pentoses en ander suikers in baie klein hoeveelhede voorkom (Vogt, 1958). Stalder (1954) het gevind dat B. cinerea genoemde twee heksoses maklik dissimileer. Volgens hom word die suikers aanvanklik vinnig verbruik. Daarna is die tempo van suikerafname stadiger, alhoewel die swam nog aktief groei. Hierdie tendens blyk ook duidelik uit Tabel 1. Slegs ras M3(iii) toon nie hierdie neiging nie en wel, soos reeds genoem, weens die feit dat dit aanvanklik baie stadiger as die ander gegroei het. Ongeveer 60% van die suiker is binne die eerste twee maande van groei deur rasse 65(iv), 10(iii) en 73(i) gedissimileer, terwyl slegs ongeveer 30% na verloop van vier maande gedissimileer is. Volgens Stalder (1954) is dit moontlik dat die swam 'n suikervoorraad opbou en sy suikerbehoefte gevolglik na verloop van tyd afneem. Vogt (1958) en Ribéreau-Gayon, Peynaud, Lafourcade en Charpentié (1955) beweer onder andere dat fruktose feitlik nie deur B.cinerea gedissimileer word nie. Stalder (1954) het gevind dat die swam in staat is om glukose vinniger as fruktose af te bou, maar dat laasgenoemde definitief ook gedissimileer kan word. Vogt (1958) beweer dat fruktose oorweeg in moste wat van Botrytis-geïnfekteerde druiwe afkomstig is, terwyl gesonde druiwemos die genoemde twee heksoses in gelyke hoeveelhede bevat. Indien dit die geval met die eksperimentele mos onder bespreking sou wees, sou die aanvanklike vinnige afname in suikers hieraan toegeskryf kon word. Dit wil dus voorkom asof die swam aanvanklik die maklik dissimileerbare glukose aanval en eers daarna die fruktose. Die groot hoeveelhede glukoon suur wat aanvanklik deur direkte oksidasie van glukose gevorm word, kan as verdere bewys dien (Tabel 9). Na 'n groeitydperk van vier maande is minder suiker gedissimileer en volgens Tabel 9 het die glukoon suur konsentrasie oor hierdie tydperk nie toegeneem nie. Soos egter reeds beskryf, het swamgroei na nege weke prakties opgehou en

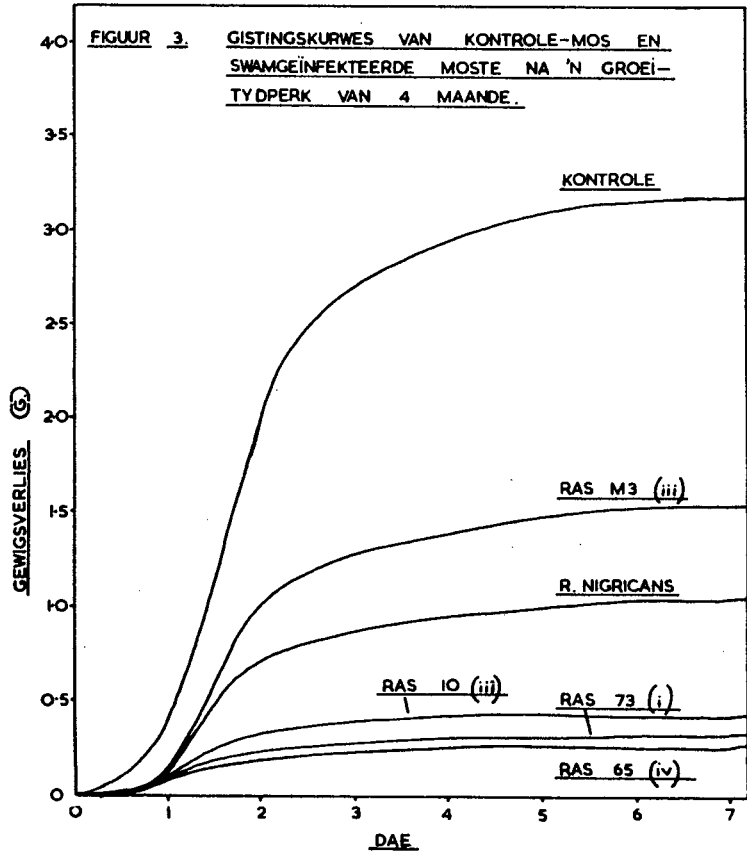
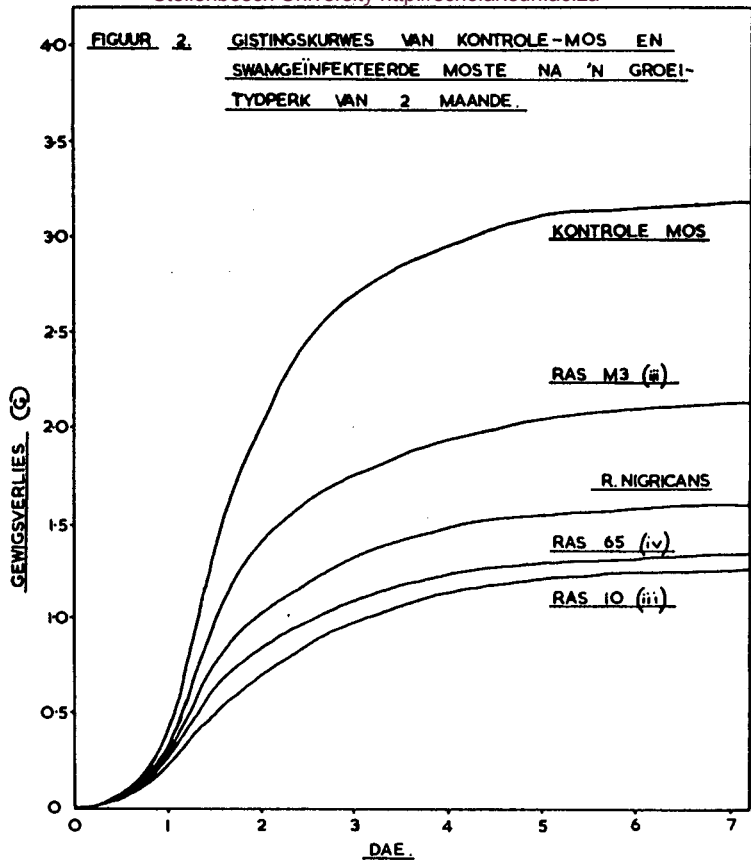
die afname in suikerverbruik kan dus ook aan hierdie faktor toegeskryf word. In werklikheid lyk dit asof die suikerdisimilasië vanaf nege weke na inenting 'n suiwer ensimatiese proses was.

Die vier rasse van B.cinerea toon ook klein verskille betreffende hulle suikerbehoefte. Die resultate van du Plessis (1936) stem hiermee ooreen. Müller-Thurgau het reeds in 1888 en 1895 melding gemaak van die feit dat B.cinerea in staat is om suikers aktief af te breek. Hy het verder gevind dat hierdie swam ongeveer vier maal soveel suiker as organiese sure as koolstofvoedsel gebruik. Hierdie bevindinge is in 1954 deur Stalder bevestig.

In hierdie studie is gepoog om die heksoses en pentoses in die eksperimentele moste kwalitatief te bepaal (1.2.2.2.). Dit is papierchromatografies gedoen, maar die resultate was baie onbevredigend.

Die gistingsproewe wat met die Botrytis- en Rhizopus moste (twee maande en vier maande) uitgevoer is, het getoon dat die gistingsaktiwiteit afneem namate die suiker- en stikstofinhoud van die moste daal. Die M3(iii)- en Rhizopus-moste het na twee maande die aktiefste gisting getoon en het ook in elke geval die hoogste suiker- en stikstofinhoud gehad (Tabelle 1 en 2). Die gistingsaktiwiteit het derhalwe ook in die vier maande moste dienooreenkomstig afgeneem. Die gistingsaktiwiteit word in Figure 2 en 3, in terme van daaglikse gewigsverlies, grafies voorgestel.

Giste benodig onder andere stikstof en koolhidrate as voedsel. Koolhidrate word tydens alkoholiese gisting na etielalkohol, CO₂ en ander verbindings omgesit (Schanderl, 1959; Vogt, 1958). Aan die hand van bogencemde is dit dus



verstaanbaar dat die gistingsaktiwiteit in die eksperimentele moste afgeneem het namate die stikstof- en suikerinhoud gedaal het. Peynaud et al. (1959), Jørgensen (1956) en Ribéreau-Gayon et al. (1955) skryf weer die stremende effek van B.cine-rea op die alkoholiese gisting van die moste aan 'n antibiotiese stof, nl. botritisien, toe. Peynaud et al. (1959) het aangetoon dat die konsentrasie van hierdie antibiotiese stof egter slegs tydens konidiospoorvorming maksimaal is. Daarna egter, neem die botritisiengehalte, vermoedelik weens die vernietiging daarvan, weer vinnig af. Hierdie feit versterk die vermoede dat die daling in gistingsaktiwiteit van die moste nie deur 'n antibiotiese stof veroorsaak word nie.

2.3. Stikstof

Die gemiddelde waardes vir die verskillende stikstof-fraksies wat in die verskillende moste bepaal is, word in Tabel 2 aangegee.

Uit die tabel is dit duidelik dat die verskillende stikstoffraksies in die swamgeïnfekteerde moste oor 'n periode van twee maande afgeneem het. Na vier maande het die waardes van al die fraksies, met uitsondering van die vry NH_3 -stikstoffraksie, egter weer 'n sterk styging getoon. Die waardes van die proteïenstikstoffraksies sowel as dié wat aangedui word as "resstikstof", m.a.w. peptiede en hoër stikstofverbindinge, het selfs die aanvanklike waardes in die kontrolemos vër oorskry.

Tabel 3 toon die afnames van die verskillende stikstoffraksies met betrekking tot die oorspronklike suiwer mos.

Die totale stikstof het by die twee maande kulture met 75-80% afgeneem, behalwe by ras M3(iii) waar die afname

Tabel 2 Gemiddelde waardes vir die verskillende stikstof-fraksies van die kontrole-mos en swamgeïnfekteerde mosse na 'n groeitydperk van 2 en 4 maande

Stikstof-fraksie	Kontrole-mos	SKIMMELKULTUUR									
		M3(iii)		65(iv)		10(iii)		73 (i)		<u>Rhizopus</u>	
<u>mg/100 ml</u>		(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Totale-N	71.6	30.9	49.2	16.1	23.1	14.3	22.9	17.4	26.3	17.7	37.7
Alkoholopl.-N	66.2	27.6	38.4	11.6	16.0	10.5	14.7	13.4	19.1	13.2	30.1
Proteïen-N	5.4	3.4	10.8	4.5	7.1	3.8	8.2	4.0	7.2	4.5	7.6
Amino-N	63.3	25.2	32.8	10.1	11.4	8.8	11.2	11.6	14.5	11.0	25.1
Vry NH ₃ -N	9.9	3.1	3.6	2.4	2.6	3.0	2.8	*	3.2	3.4	2.9
Res.-N	2.9	2.4	5.6	1.5	4.7	1.7	3.5	1.8	4.6	2.1	5.1

(a) 2 maande kultuur

(b) 4 maande kultuur

* nie bepaal nie

Tabel 3 Perseptasie afname van verskillende stikstoffraksies van swamgeinfekteerde moste na 'n groei-
tydperk van 2 en 4 maande

Stikstof- fraksie	S K I M M E L K U L T U U R									
	M3(iii)		65(iv)		10(iii)		73 (i)		<u>Rhizopus</u>	
<u>% afname</u>	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Totale-N	56.8	31.3	77.5	67.7	80.0	68.1	75.6	63.2	75.3	47.3
Alkoholopl.-N	58.3	42.1	82.5	75.8	84.1	77.9	79.8	71.1	80.1	54.5
Proteien-N	37.4	-	15.5	-	29.5	-	24.7	-	15.9	-
Amino-N	60.2	48.2	84.1	82.1	86.1	82.3	81.8	77.1	82.5	60.4
Vry NH ₃ -N	68.6	63.6	75.7	73.7	69.7	71.7	-	67.7	65.7	70.7
Res.-N	17.3	-	48.3	-	41.4	-	37.9	-	27.6	-

(a) 2 maande kultuur

(b) 4 maande kultuur

slegs 56% was. Dit is waarskynlik te wyte aan die feit dat die ras aanvanklik baie stadiger as die res ontwikkel het. Dit geld ook vir die alkoholoplosbare- en aminostikstof-fraksies. Die stikstof-fraksie wat deur alkohol neergeslaan is, en as proteïenstikstof beskou kan word, het by ras M3(iii) na twee maande groei met 37% afgeneem. Die afnames in hierdie fraksie by die ander drie Botrytis-rasse en Rhizopus het tussen 15 en 29% gewissel. Volgens hierdie resultate wil dit voorkom asof daar nie groot verskille is wat betref die stikstof-houding van die verskillende kulture nie. Ras M3(iii) is egter 'n uitsondering. Soos reeds gemeld, het die proteïenstikstof van die swam-geïnfekteerde moste na 'n groeitydperk van vier maande toegeneem tot 'n waarde wat hoër was as die van die kontrole mos. Dit geld ook vir die "resstikstof-fraksie". Die toenames word in Tabel 4 weergegee.

Tabel 4 Persentasie toename in proteïen- en resstikstof-fraksies van swamgeïnfekteerde moste na 'n groeitydperk van vier maande

	SKIMMELKULTURE				
	M3(iii)	65(iv)	10(iii)	73(i)	<u>Rhizopus</u>
	% toename				
Proteïen-N	100.5	32.7	52.8	33.8	40.8
Res.-N	93.2	62.1	20.7	58.6	75.9

Ten spyte van die feit dat ras M3(iii) deurgaans die swakste gegroei het, was die toename in die betrokke twee stikstof-fraksies by hierdie kultuur die hoogste. Die toename van hierdie fraksies kan waarskynlik toegeskryf word aan die feit dat aktiewe groei na nege weke opgehou het, dat selmateriaal

begin afsak het en dat 'n stadige outolise daarvan plaasgevind het. Op hierdie wyse kon van die selproteïene in die mos be-land het.

Die algemene toename van die aminostikstof-fraksies in die moste wat langer as twee maande met die swamkulture in aanraking was dui daarop dat die ontbinding van selmateriaal verder gegaan het as die proteïen- of hoër molekulêre stikstof-stadium. Die outolise het skynbaar egter nie tot die vry amoniakstadium gegaan nie. Die sterk toename in proteïenstikstof en resstikstof is van groot belang en dui daarop dat hoogmolekulêre stikstof vrygestel word. Hierdie hoogmolekulêre proteïenstikstof hidroliseer gedeeltelik tot aminosure en hoër peptiede en gevolglik het die aminostikstof en dus ook totale stikstof in die mos na vier maande weer toegeneem.

Dit is bekend dat swamme in staat is om selproteïene uit aminosure en ander opgeloste stikstofverbindings op te bou (Schanderl, 1959 en Fruton en Simmonds, 1960). Hulle besit egter ook proteolitiese ensieme wat hoogmolekulêre proteïen tot laer molekulêre verbindings kan afbou (Jørgensen, 1956).

In teenstelling met die vier maande moste het die swamkulture in die twee maande moste aktief gegroei en selproteïene opgebou, terwyl hulle geen of slegs 'n geringe mate van outolise ondergaan het.

Volgens Vogt (1958) wissel die stikstofgehalte van mos tussen 0.2 en 1.4 g/l. Hy beweer ook dat die stikstofgehalte van suikerryke moste gewoonlik hoër as die van suikerarme moste is. Die totale stikstofgehalte van die eksperimentele moste in hierdie studie was 0.716 g/l. Volgens Koch en Schwahn (1958) het E.K.-filtrering geen invloed op die oplosbare proteïeninhoud van druiwemos nie. Die bewering van Vogt (1958)

dat meeste afkomstig van vrot druiwe relatief arm aan stikstof is, is in hierdie studie by die Botrytis- en Rhizopus-geïnfekteerde meeste bevestig.

Die proteïenstikstof van mos bedra volgens Prillinger (1957) en Vogt (1958) ongeveer 5% van die totale stikstof. Proteïenstikstof bestaan hoofsaaklik uit peptone en albumiene, terwyl peptiede in kleiner hoeveelhede voorkom. Die stikstofbevattende verbindings in druiwemos bestaan hoofsaaklik uit aminosure. Uit Tabel 2 volg dit dat die proteïenstikstof van die kontrole-mos ongeveer 7% van die totale stikstof uitgemaak het, terwyl meeste van die stikstofverbindinge uit aminosure bestaan het. Hierdie syfers stem goed ooreen met dié van Prillinger (1957) en Vogt (1958).

By die swam-geïnfekteerde meeste het die proteïenstikstoffraksies egter toegeneem tot 'n hoogte van 10-33% van die totale stikstof, terwyl die persentasies aminosuurstikstof dienooreenkomstig gedaal het. By die twee maande kulture het 61-66% van die totale stikstof uit aminostikstof bestaan (Tabel 5), terwyl die aminostikstofinhoud van die kontrole-mos ongeveer 88% van die totaal was. In hierdie verband was die mos van ras M3(iii) weer 'n uitsondering aangesien die aminostikstof in hierdie geval 81% van die totaal bedra het. Na 'n groeitydperk van vier maande het die aminostikstof van al die swamgeïnfekteerde meeste egter verder afgeneem soos in Tabel 5 aangedui word.

Tabel 5 Aminostikstof as persentasie van die totale stikstof van die kontrole-mos en die swamgeïnfekteerde moste na 'n groeitydperk van 2 en 4 maande

Monster	Amino-N as % van totale-N	
Kontrole-mos	88.4	
	(a)	(b)
M3(iii)	81.5	66.6
65(iv)	62.5	49.4
10(iii)	61.5	48.9
73(i)	66.7	55.1
<u>Rhizopus</u>	62.2	66.5

(a) 2 maande kulture

(b) 4 maande kulture

Die afname in aminostikstof as persentasie van die totale stikstof na twee en vier maande groei, bewys dat die swamme die maklik assimileerbare aminosure as stikstofvoedsel vir sel-sintese gebruik. Hoe langer die swamme gegroei het des te minder aminostikstof was daar in verhouding tot die totale stikstof.

Met outolise van die swamweefsels is 'n deel van die geassimileerde aminostikstof, in die vorm van proteïen- en ander hoogmolekulêre stikstof, skynbaar weer aan die medium vrygestel. Hierteenoor meld Foster (1949) en Skinner et al. (1951) dat swamme in staat is om aminosure en hoër peptiede uit suikers op te bou wat dan vir die vorming van selproteïen

en ander stikstofverbindings aangewend word. Hierdie proteïensintese uit suikers via aminosure (Fruton en Simmonds, 1960) mag oor die groeitydperk van vier maande ook bygedra het tot die wins aan aminostikstof en proteïenstikstof. By 'n gebrek aan suiker en suur sal stikstofverbindings tot ammoniak afgebou word, wat dan in die medium vrygestel word (Stalder, 1954). Tabel 2 toon dat die vry ammoniakstikstof van die swamgeïnfekteerde moste baie sterk afneem tot op twee maande, maar daarna geen betekenisvolle skommeling toon nie.

Prillinger (1957) het gevind dat daar tydens die alkoholiese gisting van druiwemos 'n sterk afname in die aminosuur- en ammoniakstikstof is, terwyl die afname in hoogmolekulêre stikstof, b.v. proteïen, minder opvallend is. Teen die end van die gistingsproses neem die aminosuurstikstof as gevolg van outolise van die gisselle weer toe. Die totale stikstof neem dienooreenkomstig ook toe, maar bereik nooit die peil van die stikstof in die ongegistete mos nie.

Die waarnemings wat hier met Botrytis cinerea en Rhizopus nigricans gedoen is, stem tot 'n groot mate met hierdie bevindinge van Prillinger (1957) ooreen.

2.4. Gliserol

Soos verwag, het al die rasse van B.cinerea (Dittrich, 1964) en Rhizopus nigricans gliserol gevorm. Die hoeveelhede word in Tabel 6 weergegee.

Tabel 6 / ...

Tabel 6 Gliserolgehalte van kontrole-mos en swamgeinfekteerde moste na 'n groeitydperk van 2 en 4 maande

Monster	Gliserolgehalte g/l	
Kontrole-mos	1.2 *	
	(a)	(b)
M3(iii)	8.10	15.90
65(iv)	1.65	0.46
10(iii)	2.00	0.25
73(i)	2.40	0.39
<u>Rhizopus</u>	18.70*	17.85*

(a) 2 maande kultuur

(b) 4 maande kultuur

Die gliserolgehalte het na 'n groeitydperk van twee maande by al die rasse van B.cinerea sowel as by R.nigricans toegeneem, maar die opvallendste hoeveelhede gliserol is deur ras M3(iii) en Rhizopus gevorm. Dit het die vermoede laat ontstaan dat gliserolaldehyd of dihidroksiaseton, wat die bepaling van gliserol mag beïnvloed, hier teenwoordig was. Spesifieke bepalings vir hierdie twee verbindings het egter getoon dat hulle gladnie teenwoordig was nie. Dit kan dus aanvaar word dat die syfers in Tabel 6 slegs gliserol verteenwoordig.

Volgens die algemene skema vir die koolhidraatmetabolisme is die tussenprodukte, gliserolaldehyd en dihidroksi-

asetoon egter voorlopers van gliserol (Fruton en Simmonds, 1960). Skinner et al. (1951) het aangedui dat die gliserolvormende swamme, b.v. Aspergillus en Penicillium, gliserol volgens die algemene gistingskema vorm.

Gliserolwaardes in moste afkomstig van Botrytis-geïnfekteerde druiwe wissel tussen 2 en 24 g/l, afhangende van die graad van Botrytis-infeksie van die druiwe (Mühlberger en Grohman, 1962; Dittrich, 1964). Die swam is ook in staat om gliserol in sintetiese voedingsmedia van dihidroksiasetoon en gliseraldehid te vorm, terwyl van wynsteen-, appel- en glukoonsuur, as enigste C-bronne, geen gliserol gevorm kan word nie. In vivo word die trioses in die gefosforileerde toestand gedissimileer (Dittrich, 1964). Dittrich het ook gevind dat B.cinerea op die parasitiese (lewende druiwekorrel) sowel as op saprofitiese substrate (b.v. mos) dieselfde fisiologiese stofwisseling toon met betrekking tot gliserolvorming. In Botrytis-moste vind egter geen ophoping van dihidroksiasetoon of gliseraldehid plaas nie. Dit was dan ook die geval by die eksperimentele moste onder bespreking.

Volgens Gentile (1954) verloop die koolhidraatafbreking in B.cinerea hoofsaaklik via die pentosefosfaatsiklus. Stygende suikerkonsentrasies bevorder gliserolvorming, terwyl 'n styging in pH die gliserolkonsentrasie laat afneem (Peynaud et al., 1959). Volgens Dittrich (1964) word gliserol by 'n hoë pH dus verder gedissimileer.

Aangesien daar 'n afname in die wynsteensuur- en appelsuurkonsentrasies van die swamgeïnfekteerde eksperimentele moste was (2.5.1.4.), kon verwag word dat die pH van die moste sou styg. Dit het dan ook werklik gebeur. Volgens Nelson en Amerine (1957) besit kaliumbitartraat in mos 'n baie geringe buffervermoë by pH 4 en hoër. Die ander sure van mos, b.v. glukoonsuur en sitroensuur, besit ook geen noemenswaardige

buffervermoë nie.

Tabel 7 pH's van kontrole-mos en swamgeïnfekteerde moste na groeitydperke van 2 en 4 maande

Monster	pH	
Kontrole-mos	3.77	
	(a)	(b)
M3(iii)	3.81	4.11
65(iv)	4.35	5.39
10(iii)	4.16	4.76
73(i)	*	5.71
<u>Rhizopus</u>	3.23	3.42

- (a) 2 maande kulture
 (b) 4 maande kulture
 * nie bepaal nie

Die pH van die eksperimentele kontrole-mos was 3.77. Van Tabel 7 is dit duidelik dat die pH van die moste tydens groei gestyg het. Die afname van gliserol na 'n groeitydperk van vier maande kan dus aan die styging in pH gekoppel word. Van Tabel 6 is dit duidelik dat die gliserolgehalte by al die kulture, behalwe ras M3(iii), na 'n groeitydperk van vier maande sterk afgeneem het. Die Rhizopus-geïnfekteerde mos het slegs 'n minimale afname getoon, terwyl ras M3(iii) nog verdere hoeveelhede gliserol gevorm het. As gevolg van die relatiewe geringe afnames in wynsteensuur en appelsuur het die pH-waardes van die Rhizopus- en M3(iii)-moste ook die kleinste toenames na vier maande getoon. Rhizopus het ook uitermate groot hoeveelhede sitroensuur gevorm (Tabel 12).

Die toename of afname van gliserol in die kultuurmoste, in vergelyking met die gliserolgehalte van die kontrole-mos, word deur die kwosiënte in Tabel 8 weergegee.

Tabel 8 Kwosiënt van gliseroltoename of -afname van swamgeïnfekteerde moste, tenopsigte van die gliserolgehalte van die kontrole-mos, na groeitydperke van 2 en 4 maande

Monster	Kwosiënt	
M3(iii)	6.7	13.3
65(iv)	1.4	0.38
10(iii)	1.7	0.20
73(i)	2.0	0.33
<u>Rhizopus</u>	15.6	14.90

- (a) 2 maande kulture
 (b) 4 maande kulture

Die afname van gliserol na vier maande van swaminfeksie hou waarskynlik verband met die vorming van barnsteen-suur, soos uiteengesit onder paragraaf 2.5.1.3.. Volgens Fruton en Simmonds (1960) is sekere mikroorganismes in staat om gliserol met vetsure te laat verester om sodoende vette te vorm. Volgens Harper (1963) verloop dieselfde proses in giste.

2.5. ORGANIESE SURE

2.5.1. Vaste sure

Die sure wat van die suiwer mos en die swamgeïnfekteerde moste op die Dowex-kolom geskei is, is die volgende: glukoon-suur, galakturoon-suur, barnsteensuur, glikolsuur, appelsuur, wynsteensuur en sitroensuur. By hoër konsentrasies was daar geen definitiewe skeiding tussen barnsteensuur en glikolsuur nie. Fumaarsuur elueer eers na sitroen- en wynsteensuur uit die kolom en indien dit aanwesig is word dit saam met wynsteen- en sitroensuur geëlueer en dus as sitroensuur bepaal. Dit is gedoen om tyd te bespaar. Dit is strenggesproke 'n swakheid in die skeidingsprosedure, aangesien fumaarsuur 'n belangrike komponent van die sitroensuursiklus is en sekere swamme in staat is om fumaarsuur te vorm. Skinner *et al.* (1951) het gevind dat Rhizopus nigricans redelike hoeveelhede fumaarsuur kan vorm. Hierdie suur kon egter nie in die sitroensuur- wynsteensuurfraksie van die Rhizopus- en Botrytis-moste geïdentifiseer word nie.

2.5.1.1. Glukoon-suur

By die titrasie van die fraksies wat glukoon-suur bevat het, kon geen definitiewe eindpunt met fenolftaleien verkry word nie. Die rede hiervoor is waarskynlik dat 'n deel van die suur in die laktoon-vorm aanwesig was. Op papierchromatogramme is die laktoon by suiwer glukoon-suur sowel as by die glukoon-suurfraksie van die Botrytis-moste as 'n tweede dowwer kol verkry. Deur die fraksies wat glukoon-suur bevat, d.w.s. fraksies 20-30, voor titrasie effens te verhit, word die laktoon vinniger deur die alkali na die vry suur gehidroliseer en gevolglik word 'n duideliker omslagpunt van die indikator by die eindpunt van die titrasie verkry.

Die hoeveelhede glukoonsuur wat deur die Botrytis-rasse gevorm is, word in Tabel 9 aangetoon.

Tabel 9 Glukoonsuur- en galakturoonsuurinhoud van kontrole-
mos en swamgeïnfekteerde moste na 'n groeitydperk
van 2 en 4 maande

Monster	Glukoonsuur g/l		Galakturoonsuur g/l	
Kontrole- mos	0.3488		0.2453	
	(a)	(b)	(a)	(b)
M3(iii)	2.3750	0.8453	0.2686	0.2235
65(iv)	2.9400	1.2070	0.0969	0.0810
10(iii)	3.9070	1.2470	0.1507	0.0805
73(i)	2.1270	0.3558	0.1073	0.0729
<u>Rhizopus</u>	0.2879	0.2659	0.3275	0.2643

(a) 2 maande kulture

(b) 4 maande kulture

Die vier rasse van B.cinerea het dus na 'n groeitydperk van twee maande uitermate groot hoeveelhede van die suur gevorm, terwyl daar na 'n groeitydperk van vier maande weer 'n groot afname in die glukoonsuurkonsentrasie waargeneem is. Rhizopus het hom egter algeheel anders gedra. Die glukoonsuurgehalte het na twee maande met 17% gedaal en daarna prakties dieselfde gebly. Ras 10(iii) het die grootste hoeveelheid glukoonsuur gevorm, maar die mos waarin dit vir vier maande gegroei het, het ook die grootste afname getoon.

Mos afkomstig van Botrytis-besmette druiwe bevat altyd glukoonsuur in hoeveelhede tot 2 g/l, terwyl mos van gesonde druiwe geen of slegs spore van die suur bevat. Die aanwesigheid van glukoonsuur in mos is 'n bewys dat dit vanaf Botrytis-besmette druiwe afkomstig is (Peynaud et al., 1959).

Die vorming van glukoonsuur deur B.cinerea en ander skimmelswamme gaan volgens Rentschler en Tanner (1955 en 1955(a)) gepaard met die vorming van glukuroonsuur. Laasgenoemde suur is egter nie in enige van die suurfraksies van die eksperimentele moste aangetref nie. Ribéreau-Gayon (1960) berig ook van die vorming van glukoonsuur deur B.cinerea en Ribéreau-Gayon et al. (1955) skryf die vorming van die suur aan die direkte oksidasie van glukose toe. Carlson (1960) wat gewerk het op die vorming van glukoonsuur deur die swam Aspergillus niger het gevind dat hierdie en ander organismes glukoonsuur deur die oksidasie van glukose vorm. Hierdie omsetting is 'n eenvoudige oksidasie, wat ook deur 'n selvrye ensiem, glukoseoksidase ('n dehidrogenase) teweeggebring word. Penicillium-spesies vorm ook glukoonsuur, die produksie waarvan deur 'n lae stikstofgehalte van die medium bevorder word. Botrytis cinerea besit ook die ensiem glukoseoksidase (Rentschler en Tanner, 1955 en 1955(a)).

Die afname in glukoonsuur in die moste wat deur die eksperimentele swamkulture na vier maande teweeggebring is, kan deur die werking van die pentosefosfaatsiklus in B.cinerea verklaar word (Gentile, 1954). Glukose word direk geoksideer en die gevormde glukoonsuur word in gefosforileerde toestand (fosfoglukonaat) via pentose fosfaat en triosefosfaat na pirovaat geoksideer. Die laaste stappe verloop volgens die Embden-Meyerhof skema. Pirovaat is 'n metaboliese aktiewe verbinding en word o.a. in die Kresbssiklus verder gemetaboliseer.

2.5.1.2. Galakturoonsuur

Hierdie suur elueer net na glukoonsuur uit die Dowex-skeidingskolom en was aanwesig in fraksies 30-36. Tabel 9 toon dat die galakturoonsuurinhoud in die meeste waarop ras M3(iii) en Rhizopus vir twee maande gegroei het, toegenem het. Die galakturoonsuurinhoud van die suiwer mos was 0.2453 g/l. Ras M3(iii) het die suurgehalte met slegs 9.4% laat toeneem, terwyl Rhizopus 'n toename van 33.5% getoon het. In teenstelling hiermee het die ander rasse van B.cinerea groot afnames in die galakturoonsuurgehalte teweeggebring. Soos uit Tabel 10 gesien kan word, het al die swamme 'n afname in suurkonsentrasie na 'n groeitydperk van vier maande teweeggebring.

Tabel 10 Persentasie afnames in galakturoonsuur na 'n groeitydperk van 2 en 4 maande

Monster	% Afname	
M3(iii)	-	8.9
65(iv)	60.5	67.0
10(iii)	38.6	68.0
73(i)	56.3	71.0
<u>Rhizopus</u>	-	-

(a) 2 maande kulture

(b) 4 maande kulture

Dit is opvallend dat slegs ras M3(iii) en Rhizopus na twee maande galakturoonsuur gevorm het en eers na vier maande weer 'n afname getoon het. Dit moet waarskynlik aan 'n sterker

pektinase-aktiwiteit van die twee swamme toegeskryf word. Na 'n tydperk van vier maande was die galakturoonsuurinhoud van slegs die Rhizopus-mos nog hoër as die van die kontrole-mos.

Galakturoonsuur is die basiese bousteen van pektiene wat in die selwande en middellamella van druiwe en ander vrugte voorkom. Pektiene is dus polimere van galakturoonsuur (Meyer, 1960) en kom volgens Vogt (1958) slegs in klein hoeveelhede in mos voor (0.06-1.08 g/l). Die ensiem pektinase (pektienpoligalakturonase), wat in Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Penicillium, Botrytis en ander skimmelswamme voorkom, hidroliseer pektiene tot mono-, di- en trigalakturoonsuureenhede (Kertesz, 1951; Nyeste en Halló, 1963 en Nyeste, Halló en Kovács, 1963).

Die galakturoonsuurgehalte van die kontrole-mos was baie laag en dit kan toegeskryf word aan die feit dat die pektiene tydens die voorafbevriësing en E.K.-filtrasie uit die mos verwyder is. Daar was dus geen bron waaruit galakturoonsuur gevorm kon word nie. Rhizopus en B.cinerea is in staat om pektiene na galakturoonsuureenhede te hidroliseer (Rentschler en Tanner, 1955).

Rhizopus en Botrytis is van die weinige skimmelswamme wat kutikulêre infeksie kan veroorsaak. 'n Ensiem wat deur B.cinerea geproduseer word, los die middellamella van subkutikulêre selle op en simptome van die sogenaamde "slip skin" is die gevolg (Nelson, 1951). Pektinase word altyd deur B.cinerea, ongeag die samestelling van die voedingsmedium, gevorm (Gäumann en Böhni, 1947). Volgens Kielhöfer en Würdig (1961) kan B.cinerea en ander swamme galakturoonsuur na slymsuur omsit. Die reaksie word deur ensieme gekataliseer. Hier-

die omsetting bied 'n verklaring vir die afname in galaktur-oonsuurinhoud van die eksperimentele Botrytis- en Rhizopus-geïnfekteerde moste. In hierdie studie is die slymsuurgehalte, indien enige, nie bepaal nie.

2.5.1.3. Barnsteensuur en glikolsuur

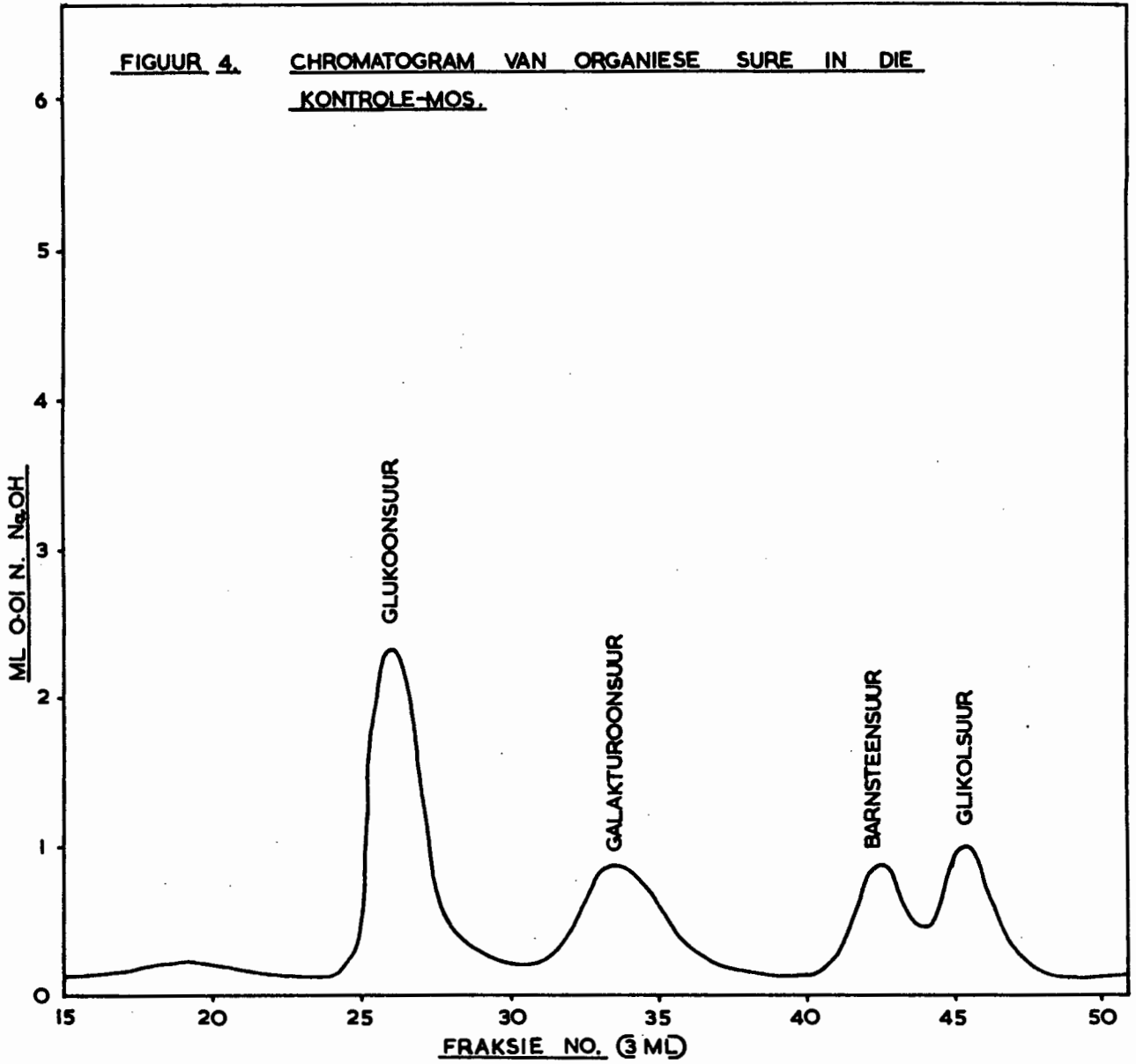
Hierdie sure word tussen fraksies 40 en 50 uit die skeidingskolom geëluëer. Waar die konsentrasie van die twee sure laag is, is die skeiding byna volledig (Fig'e 4 en 5), maar by hoë konsentrasies (Fig'e 6 en 7) is daar 'n sterk oorvleueling van die fraksies wat hierdie sure bevat.

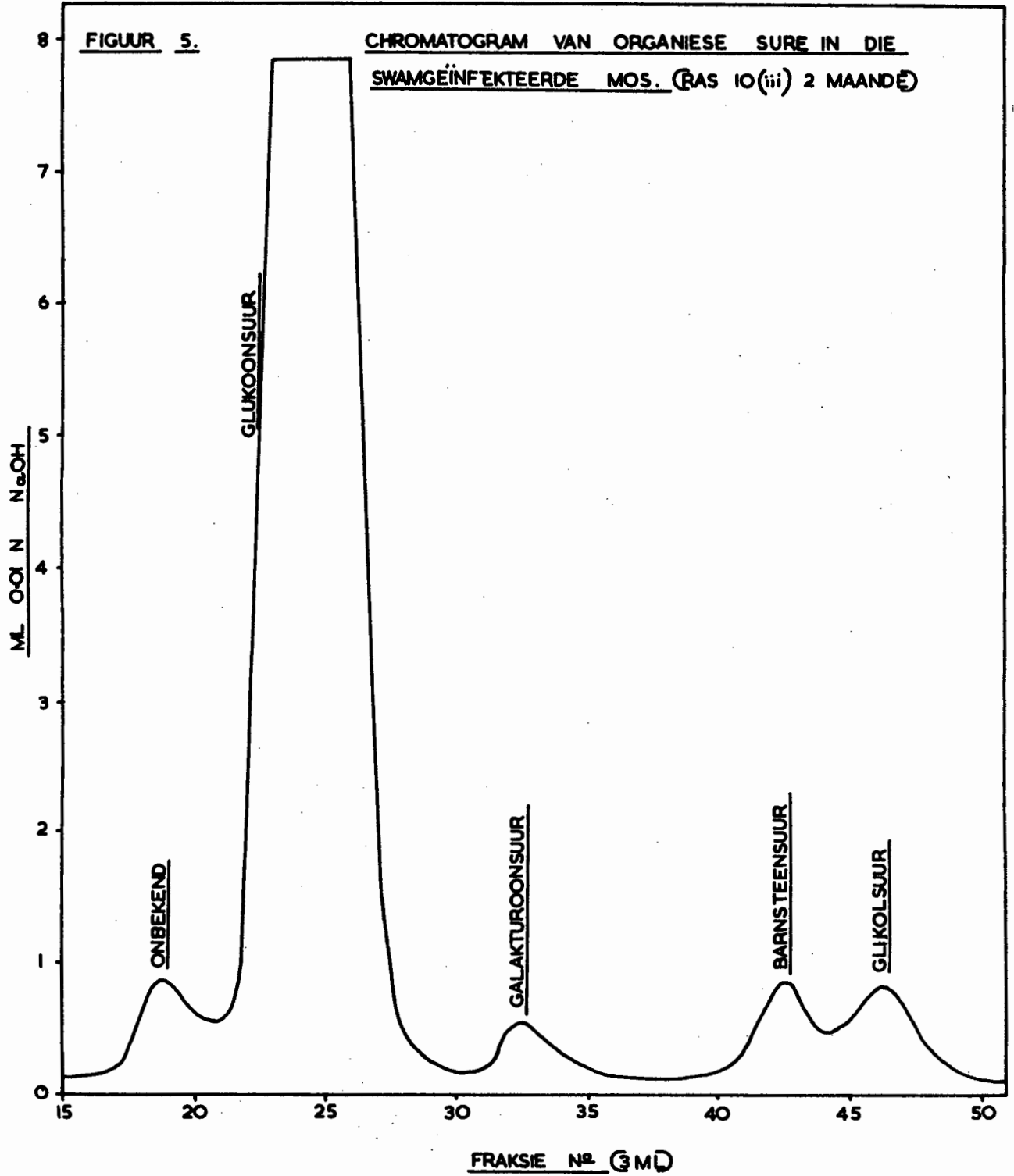
Tabel 11 Barnsteen- en glikolsuurinhoud van die kontrole-mos en moste wat aan 2 en 4 maande groeitydperke van die swamme onderwerp was.

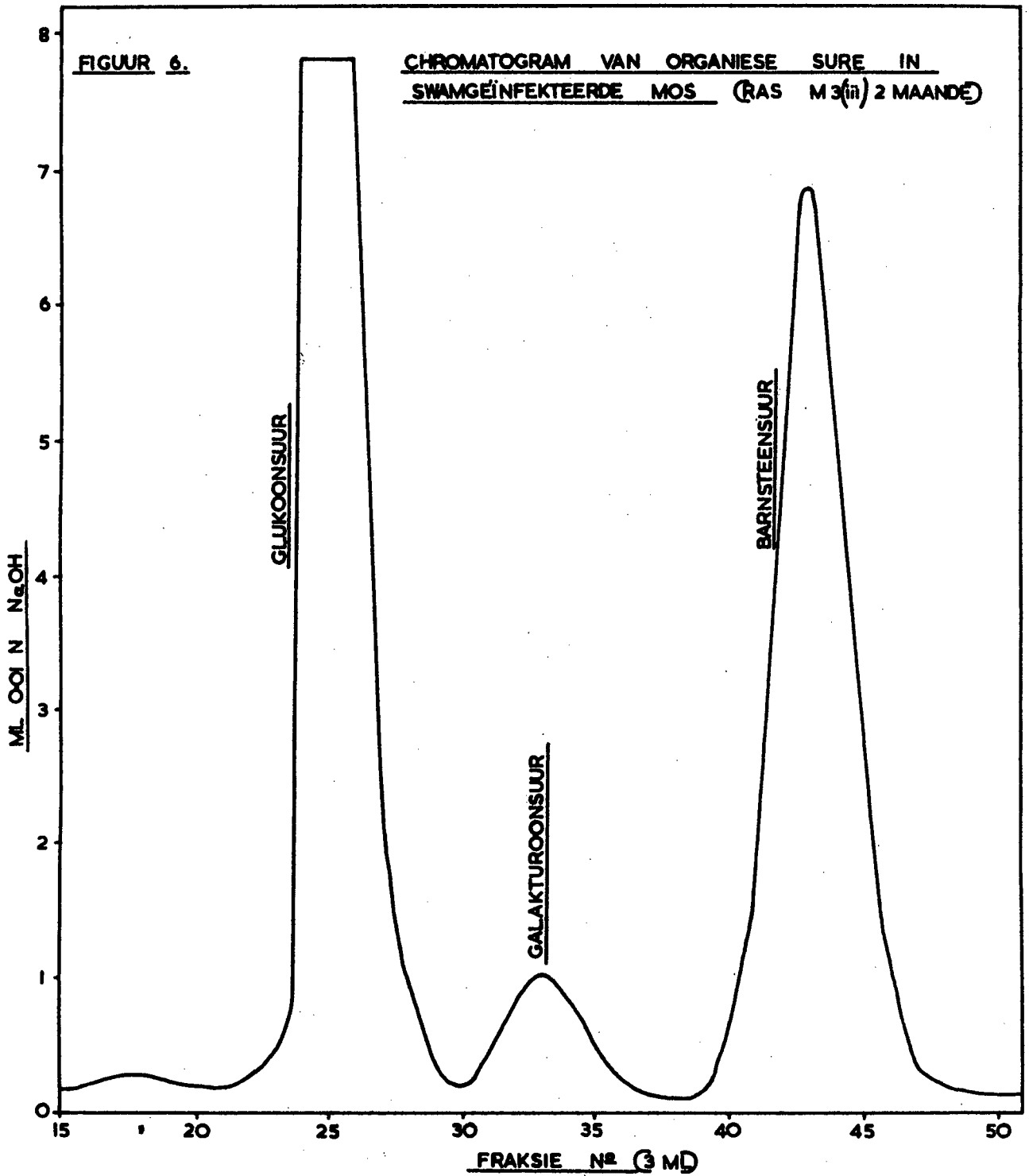
Monster	Barnsteensuur g/l		Glikolsuur g/l	
	(a)	(b)	(a)	(b)
Kontrole-mos	0.031		0.066	
M3(iii)	0.207	0.689	0.374	0.117
65(iv)	0.178	0.121	0.160	0
10(iii)	0.023	0.089	0.094	0
73(i)	0.174	0.102	0.013	0
<u>Rhizopus</u>	0.454	0.358	0.078	0

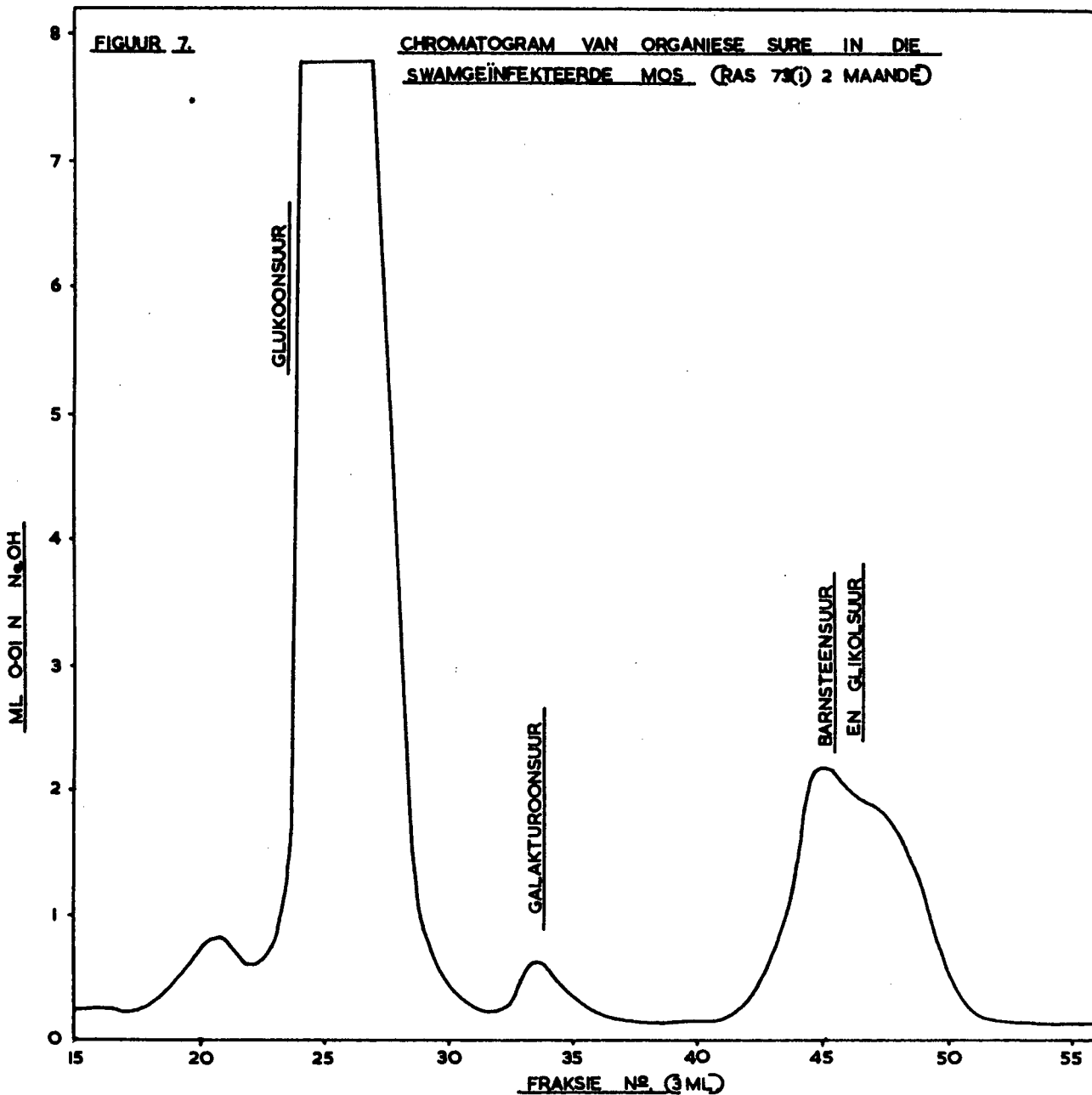
(a) 2 maande kulture

(b) 4 maande kulture









Die moontlikheid bestaan ook dat die suur wat saam met barnsteensuur geëlueer word diglikolsuur mag wees. Volgens Buch et al. (1952) het glikol- en diglikolsuur dieselfde R_f -waarde.

Alhoewel glikolsuur sowel as barnsteensuur tydens die standaardisasie van die Dowex-skeidingskolom gebruik is, is glikolsuur nooit saam met barnsteensuur geëlueer nie; glikolsuur kon trouens in geeneen van hierdie eluate gevind word nie (1.2.2.4.).. Aangesien chemiese rein diglikolsuur nie bekombaar was nie, kon geen toetse deurgevoer word om vas te stel of dit saam met barnsteensuur, al dan nie, uit die Dowex-kolom geëlueer word nie. Vervolgens is die eluaat van die Dowex-kolom op 'n silikagelkolom oorgebring (bladsy 13) en dit is gevind dat barnsteensuur en glikolsuur wel skei. Die skeiding was identies met dié wat verkry is met barnsteen- en glikolsuurstandaarde op 'n silikagelkolom. Die feit dat barnsteen- en diglikolsuur struktureel naverwant is, het egter die vermoede laat ontstaan dat dit wel diglikolsuur is wat saam met barnsteensuur uit die Dowex-kolom geëlueer het. Volgens hierdie resultate word die betrokke suur as glikolsuur aangedui.

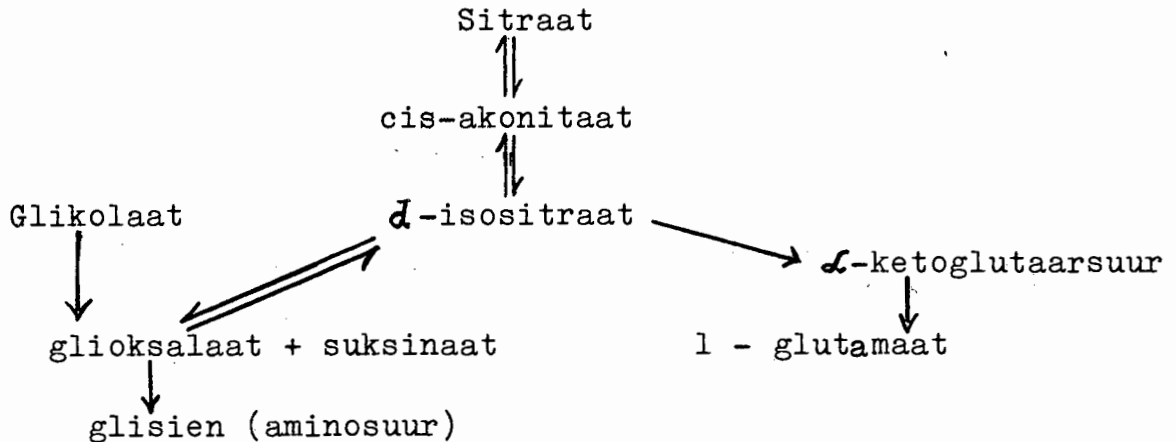
Die barnsteensuurgehalte van die kontrole-mos was 0.031 g/l en van Tabel 10 volg dit dat die suur by alle twee maande kulture toegeneem het. Na 'n groeitydperk van vier maande het ras M3(iii) 'n baie groot toename in barnsteensuur-konsentrasie teweeggebring, terwyl die toename by ras 10(iii) gering was. Die ander kulture het almal 'n afname in barnsteensuur veroorsaak. Die glikolsuurgehalte van die kontrole-mos was 0.066 g/l en hierdie konsentrasie het na twee maande groei by al die kulture, uitgesonderd ras 73(i), toegeneem. Ras M3(iii) het weer die grootste hoeveelhede van die suur gevorm. Na 'n groeitydperk van vier maande het al die swamme,

behalwe ras M3(iii), glikolsuur totaal gedissimileer.

Volgens Vogt (1958) en Rentschler en Tanner (1955 (a)) bevat druiwe, veral onryp druiwe, klein hoeveelhede barnsteensuur en waarskynlik ook glikolsuur sowel as glioksaalsuur. Finar (1959) meld dat glikolsuur definitief in onryp druiwe aanwesig is. Jefferson, Foster, Phares en Carson (1952) beweer dat swamme, o.a. R.nigricans, in staat is om barnsteensuur uit formiaat te vorm. Gentile (1954) verwys in sy werk na die bevindinge van Nord en Vitucci in verband met die ontstaan van barnsteensuur. Hulle het gevind dat daar by sekere swamme 'n alternatiewe omkeerbare metabliese roete is waarvolgens barnsteensuur uit mieresuur via glioksaal-, glikol- en asynsuur gevorm kan word. Volgens Vogt (1958) en Haehn (1952) word barnsteensuur tydens alkoholiese gisting deur sekere giste gevorm, veral tydens die stormagtige stadium. Glutamiensuur, wat 'n produk van die proteïenmetabolisme van gis is, dien hier as uitgangstof en word via α -ketoglutaarsuur na barnsteensuur geoksideer. Ander navorsers is weer van mening dat barnsteensuur tydens gisting uit heksoses via aset-aldehyd of pirodruiwesuur gevorm word (Vogt, 1958). Volgens Franke, Jilge en Eichhorn (1961) is glioksalaat transaminases in A.fumigatus, A.oryzae, P.glaucum, Mucor racemosus, Rhizopus nigricans, B.cinerea en baie ander swamme teenwoordig. Glioksalaat transaminases van die swamme kataliseer die transaminering van glioksaalsuur met aminosure, veral glutamiensuur, om glisien te vorm. Nuweprodukte van die reaksie is glikolsuur en oksaalsuur. Glutaminaat-pirovaat transaminases is ook aanwesig en ketosure, b.v. α -ketoglutaarsuur, word gevorm.

Olson (1954, 1959) berig dat skimmelswamme, b.v. Penicillium-, Aspergillus- en Rhizopus-spesies, isositroensuur kan splits om glioksaalsuur en barnsteensuur te vorm. Die

isositritase ensiemsisteesem bewerkstellig hierdie omsetting in genoemde swamme omkeerbaar soos in onderstaande skema uiteengesit word.



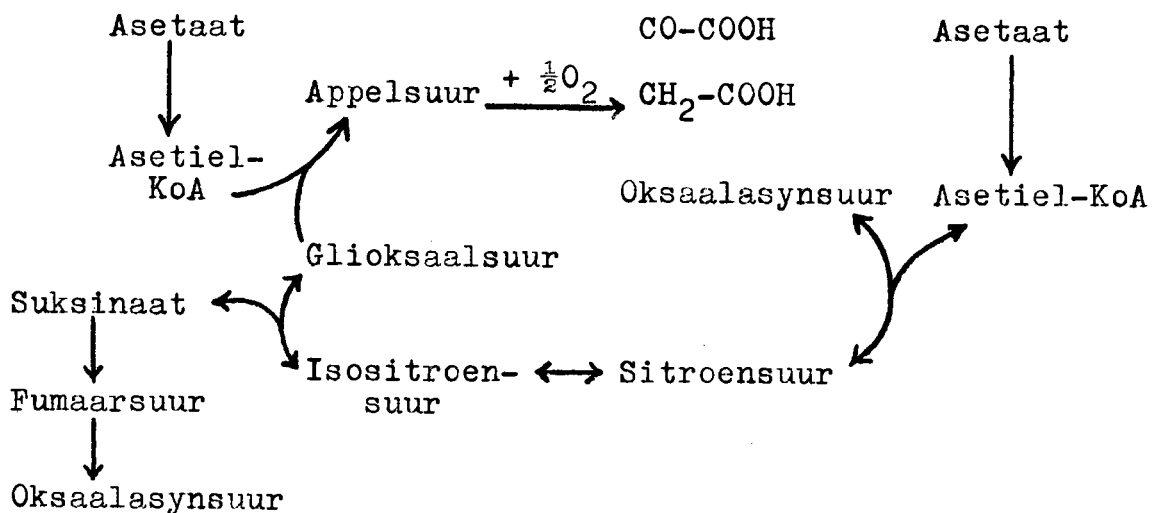
Figuur 8

Fruton en Simmonds (1960) en Kornberg en Krebs (1957) maak ook melding van die bostaande omsettings in swamme en ander mikrobies.

Benewens die bogenoemde ensiemsisteesem is die ensiem, barnsteensuurdehidrogenase, in B.cinerea en ander skimmelswamme gevind (Novàk en Voros-Felkai, 1958; Barinova, 1960 en Novàk, 1958). Dit dui daarop dat 'n gemodifiseerde trikarboksiesuursiklus in swamme funksioneer (Franke et al., 1961 en Gentile, 1954).

'n Ander siklus, nl. die glioksaalsuursiklus, kom ook in mikroörganismes voor wat die ensieme malaatsintetase en isositritase bevat (Fig. 9). Hierdie siklus verplaas die stappe vanaf isositroensuur na appelsuur in die sitroensuursiklus en kan dus as 'n variasie van laasgenoemde siklus beskou word

(Kornberg en Krebs, 1957). As die suksinaat wat vorm verder gemetaboliseer word, kan die siklus, tesame met die daaropvolgende reaksies van suksinaat, tot die sintese van ander metaboliete. soos fumaarsuur en oksaalasynsuur, lei.



Figuur 9

Hierdie siklus verskil van dié in Figuur 8 deurdat deurdat C_2 -verbindings die uitgangstowwe is. Sitroensuur is die end-produk van die oksidatiewe metabolisme van asetate en ander C_2 -verbindings.

In sekere bakteriese sisteme kan barnsteensuur ook uit pirodruiwesuur ontstaan. Soos reeds gesê kan laasgenoemde uit gliserol gevorm word en kan dit via oksaalasynsuur, appelsuur en fumaarsuur na barnsteensuur omgesit word (Fru-ton en Simmonds, 1960).

Uit die bespreking van bostaande literatuur is dit duidelik dat barnsteen-, glikol- en glikoësuur belangrike skakels in die intermediêre metabolisme tussen koolhidrate en proteïen is. Die vorming van sure kan dus op verskillende maniere plaasvind en wel met verskillende verbindings as uitgangstowwe.

2.5.1.4. Appelsuur en wynsteensuur

Hierdie twee sure oorweeg in moste, terwyl sitroensuur in kleiner hoeveelhede voorkom (Vogt, 1958).

Tabel 12 Appel-, wynsteen- en sitroensuurgehaltes van die kontrole-mos en moste waarop die swamme vir 2 en 4 maande gegroei het

Monster	Appelsuur g/l		Wynsteensuur g/l		Sitraensuur g/l	
Kontrole- mos	3.094		2.773		0.139	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
M3(iii)	2.302	1.136	2.368	1.511	0.203	0.435
65(iv)	0.974	0.281	0.595	0.310	0.751	0.725
10(iii)	0.546	0.222	0.747	0.185	1.621	1.609
73(i)	0.741	0.237	0.378	0.285	1.517	1.220
<u>Rhizopus</u>	5.129	3.581	2.986	2.282	3.093	1.945

(a) 2 maande kulture

(b) 4 maande kulture

Van Tabel 12 is dit duidelik dat al die rasse van B.cinerea groot hoeveelhede appel- en wynsteensuur gedissimileer het. Na 'n groeitydperk van twee maande het ras 10(iii) die grootste afname in appelsuur- en ras 73(i) die grootste afname in wynsteensuur teweeggebring. Na vier maande het almal behalwe ras M3(iii) ongeveer 90% van die appel- en wynsteensuur verbruik.

Tabel 13 Persentasie afname in appel- en wynsteensuur van die kontrole-mos nadat die rasse van B.cinerea en Rhizopus vir 2 en 4 maande daarop gegroei het

Monster	Appelsuur % afname		Wynsteensuur % afname	
	(a)	(b)	(a)	(b)
M3(iii)	25.6	63.3	14.6	45.5
65(iv)	68.5	90.9	78.6	88.8
10(iii)	82.4	92.8	73.1	93.3
73(i)	76.1	92.3	86.4	89.7
<u>Rhizopus</u>	-	-	-	18.0

(a) 2 maande kulture

(b) 4 maande kulture

Na vier maande het ras M3(iii) nog minder appel- en wynsteensuur verbruik as die ander rasse na 'n tydperk van twee maande. Dit wil dus voorkom asof hierdie ras nie so 'n sterk dissimileerder van sure is nie. B.cinerea gebruik benewens suikers

veral wynsteen- en appelsuur as koolstofbron (du Plessis, 1936). Peynaud et al. (1959), Rentschler en Tanner (1955(a)), Ribéreau-Gayon (1960) en ander navorsers maak melding van die vernietiging van appelsuur en wynsteensuur deur B.cinerea. Sommige beweer dat die swam appelsuur bo wynsteensuur verkies en dus groter hoeveelhede appelsuur verbruik, terwyl andere weer die teenoorgestelde bewering maak.

Volgens Tabel 13 blyk dit dat sekere rasse van B.cinerea voorkeur aan een van hierdie twee sure gee, alhoewel die verskille nie so groot is dat dit enigsins betekenisvol is nie. Rasse 65(iv) en 73(i) het na twee maande ongeveer 10% meer wynsteensuur as appelsuur gedissimileer, terwyl rasse M3(iii) en 10(iii) weer ongeveer 10% meer appelsuur as wynsteensuur verteer het. Hierdie verskille het egter na 'n groeitydperk van vier maande totaal verdwyn, behalwe in die geval van ras M3(iii) waar ongeveer 20% meer appelsuur as wynsteensuur verbruik is. Stalder (1954) het gevind dat B.cinerea beide sure ewe geredelik afbou, maar dat daar wel verskille kan voorkom aangesien daar oneindig baie geneties verskillende stamme van B.cinerea kan bestaan.

Tabel 12 toon dat Rhizopus nigricans 'n toename in appelsuur teweegbring het, terwyl wynsteensuur feitlik onaangeraak gebly het. Na 'n groeitydperk van vier maande het slegs 'n geringe afname in laasgenoemde suur voorgekom. Op grond hiervan, en die toename in appelsuurkonsentrasie, wil dit voorkom asof R.nigricans nie van hierdie sure in die mos vir sy voeding gebruik gemaak het nie. Gedurende dieselfde groeitydperk van vier maande het Rhizopus 70% van die suiker gedissimileer (Tabel 1) en heelwat barnsteensuur is ook gevorm (Tabel 11).

Jefferson et al. (1952), Mečír (1946) en Márquez en Llaguno (1958) het gevind dat Rhizopus-spesies en ander swamme in staat is om appelsuur en ander sure te sintetiseer.

2.5.1.5. Sitroensuur

Die vorming van sitroensuur deur skimmelswamme is reeds goed bekend. Stalder (1954) berig dat Muttelet in 1923 'n drievoudige toename in sitroensuur van moste, waarop B.cinerea gegroei het, verkry het. Rentschler en Tanner (1955) het gevind dat B.cinerea 'n toename van meer as 100% van die suur in moste, afkomstig van edelvrotdruive, kan veroorsaak.

Tabel 14 Kwosiënt van sitroensuurtoename in swangeïnfekteerde moste na 'n groeitydperk van 2 en 4 maande, bereken volgens die sitroensuurgehalte van die kontrole-mos

Monster	Kwosiënt	
	(a)	(b)
M3(iii)	1.4	3.1
65(iv)	5.4	5.2
10(iii)	11.7	11.6
73(i)	10.9	8.8
<u>Rhizopus</u>	22.3	14.0

(a) 2 maande kulture

(b) 4 maande kulture

Van Tabel 14 is dit duidelik dat veral rasse 10(iii) en 73(i) en Rhizopus 'n groot toename in die sitroensuurgehalte van die mos, na 'n groeitydperk van twee maande, teweegbring het. Na vier maande het slegs ras M3(iii), waarskynlik weer as gevolg van sy aanvanklike stadige groei, nog 'n toename van sitroensuurkonsentrasie in die mos getoon. Al die ander rasse van B.cinerea het baie klein afnames getoon, terwyl Rhizopus 'n groot vermindering van die suur teweegbring het.

Die vorming van sitroensuur is 'n algemene verskynsel by swamme van die genera Rhizopus, Aspergillus, Mucor, Penicillium ens. (Skinner et al., 1951) en sommige navorsers is van mening dat dit direk van glukose (heksose) afkomstig is. Die suiker word via glukoonsuur, slymsuur en β, δ -diketo-adipiensuur na sitroensuur omgesit. 'n Ander groep navorsers is weer van mening dat die suiker eers na asynsuur afgebreek word en dat laasgenoemde dan na barnsteensuur en akonitiensuur omgesit word. Akonitiensuur word na sitroensuur gehidroliseer, terwyl barnsteensuur na fumaarsuur en verder na appelsuur omgesit word (Skinner et al., 1951). 'n Meer presiese uiteensetting van hierdie omsettinge deur swamme is reeds by die vorming van barnsteensuur en glikolsuur bespreek (2.5.1.3.).

Kornberg en Krebs (1957) en Gentile (1954) het bewys dat A.niger in staat is om sitroensuur uit suikers te sintetiseer deurdat C₆-suikers, via fosfoglukonaat en pentosefosfaat, na triosefosfaat omgesit word. Die sitroensuur ontstaan deur verdere oksidasie van die triosefosfaat na pirovaat, binding van CO₂ en kondensering van die gevormde oksaalasetaat met 'n molekule asetiel-KoA. Die voorkoms van lae konsentrasies van die ensiem isositritase in skimmels (Olson, 1954) is egter verantwoordelik vir die ophoping van die suur deur middel van die gliksaalsuursiklus. Die ophoping van fumaarsuur

in die skimmels (b.v. R.nigricans) kan volgens Kornberg en Krebs (1957) toegeskryf word aan die afwesigheid of lae aktiwiteit van die ensiem fumarase.

In die eksperimentele kulture van B.cinerea en R.nigricans is, soos reeds genoem, geen fumaarsuur gevorm nie. Dit mag die gevolg van 'n hoë fumarase-aktiwiteit van die swamme wees. Fumaarsuur word waarskynlik na oksaalasynsuur omsit wat weer verdere metaboliese transformasies ondergaan. Fumaarsuur kon dus nie ophoop nie.

2.5.2. Vlugtig sure

Botter-, propioon-, asyn- en mieresuur is in die eksperimentele moste bepaal. Eersgenoemde twee sure het slegs in minimale hoeveelhede in die moste voorgekom of was totaal afwesig. Hulle is gevolglik nie by die onderstaande tabel ingesluit nie.

Tabel 15 dui die toe- en afnames van totale vlugtige sure sowel as asyn- en mieresuur in die moste aan. Uit die tabel is dit duidelik dat die som van die ekwivalente hoeveelhede asyn- en mieresuur nie ooreenstem met die totale aantal ekwivalente vlugtige suur (as asynsuur) wat in die moste gevind is nie. Hierdie verskille kan nie aan die weglating van propioon- of bottersuur toegeskryf word nie, omdat slegs minimale hoeveelhede van hierdie sure in die mos teenwoordig was. Die rede vir hierdie verskille kan toegeskryf word aan hoër vlugtige sure wat tydens stoomdistillasie oorgestook het, of deur oordraging van nie-vlugtige sure in die distillaat. Hierdie sure is tesame met die laer vlugtige sure dus as totale vlugtige suur getitreer, terwyl hulle by die skeiding

van die sure op die silikagelkolom nie bepaal is nie.

Tabel 15 Totale vlugtige-, asyn- en mieresuurgehaltenes van die kontrole-mos en moste waarop die swamkulture vir 2 en 4 maande gegroei het

Monster	Totale vlug- tige suur g/l (as asynsuur)		Asynsuur g/l		Mieresuur g/l	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Kontrole- mos	0.219		0.187		0.021	
M3(iii)	0.208	0.230	0.118	0.230	0.029	0.043
65(iv)	0.302	0.115	0.147	0.063	0.075	0.020
10(iii)	0.177	0.182	0.129	0.047	0.036	0.014
73(i)	0.230	0.132	0.209	0.182	0.059	0.041
<u>Rhizopus</u>	0.235	0.093	0.100	0.038	0.064	0.012

(a) 2 maande kulture

(b) 4 maande kulture

Die totale vlugtige suurgehalte van die swamein-
fekteerde moste het oor die algemeen na twee maande dieselfde
gebly. Die mos van ras 65(iv) het wel 'n toename van 36%
getoon, terwyl ras 10(iii) 'n afname van 18% teweegbring
het. Die asynsuurgehalte van die moste het afgeneem, terwyl
die mieresuurgehalte by al die swamkulture toegeneem het.
Slegs ras 73(i) het 'n baie geringe toename in appelsuur
teweegbring. Die mos waarop Rhizopus gegroei het, het die

grootste afname in asynsuur ondergaan.

Na 'n groeitydperk van vier maande het die vlugtige suurinhoud van die moste, veral die van die Rhizopus mos, afgeneem. Met uitsondering van ras M3(iii) was dit ook die geval met die asynsuurinhoud van die moste. Behalwe in die geval van ras M3(iii) het die mieresuurgehalte na vier maande weer skerp gedaal. Die toename in die suur wat ras M3(iii) teweeggebring het was $\pm 50\%$.

Nelson en Amerine (1957(a), 1957(b)) het ook gevind dat die totale vlugtige suurgehalte van moste afkomstig van Botrytis-geïnfekteerde druiwe baie laag is (0.06 tot 0.33g/l) en dat die swam prakties geen invloed op die vlugtige suurgehalte het nie.

HOOFSTUK IIIGEVOLGTREKKINGS

Die biochemiese veranderinge wat deur aktiewe kulture van Botrytis cinerea en Rhizopus nigricans in druiwemos teweeggebring word, is ondersoek. Al die kulture wat gebruik is, is geselekteer uit 'n wye reeks isolate wat uit verskillende wingerde van die Suid-Afrikaanse wynbou-area gemaak is. Die volgende gevolgtrekkings kan uit hierdie studie gemaak word:

1.

Daar is in geslaag om konstante kulture van B.cinerea te verkry. Enkelspoorisolate van die kulture het geneties konstante rasse opgelewer waarvan vier, wat die grootste morfologiese verskille getoon het, vir die eksperimentele werk gekies is.

2.

Uitgesonderd ras M3(iii) het die geselekteerde rasse van die swam dieselfde groeiselheid op mos getoon. Die groeiselheid was min of meer in verhouding met die mate van metabolismiese aktiwiteit.

3.

Rasse 65(iv), 10(iii) en 73(i) het feitlik dieselfde mate van suikerverlies in die mos teweeggebring, terwyl ras M3(iii) verreweg die minste suiker gedissimileer het. Die omsetting van glukose na glukoonuur en die verdere afbou is aan die hand van die literatuur bespreek.

4.

Die gistingsaktiwiteit van die swamgeïnfekteerde moste staan in direkte verband met die stikstof- en suiker-gehaltes daarvan. Dit wil dus voorkom asof 'n verlaging in gistingsaktiwiteit van Botrytis-geïnfekteerde moste aan 'n voedselgebrek van die giste toegeskryf moet word en nie soseer aan die afskeiding van inhiberende antibiotiese stowwe nie.

5.

Nadat die swamme vir vier maande op die mos gegroei het, het hulle 'n verhoging in al die stikstoffraksies van die mos, tot 'n waarde wat hoër was as die van die twee maande kultuurmoste, teweeggebring. Hoogmolekulêre proteïen- en residuele stikstof het toegeneem tot 'n waarde wat hoër was as die van die kontrole-mos. Die swamme gebruik aanvanklik die maklik assimileerbare aminostikstof en vry ammoniakstikstof vir selsintese. Later word die stikstof weer, veral in die vorm van proteïene, deur middel van seloutolise aan die medium vrygestel. Gedeeltelike ensimatiëse hidrolise van die vrygestelde proteïenstikstof het nie verder as die amminosuurstadium gegaan nie, aangesien die vry ammoniakstikstof in die moste na twee en vier maande dieselfde was. Die waarskynlike metaboliese omsettinge van die stikstofverbinding is aan die hand van die literatuur bespreek.

6.

Al die Botrytis-rasse en Rhizopus het gliserol gevorm. Die afnames na 'n groeitydperk van vier maande kon met 'n styging in die pH van die moste in verband gebring word.

7.

B.cinerea vorm groot hoeveelhede glukoon-suur, terwyl slegs ras M3(iii) en R.nigricans galakturoon-suur gevorm het. Drie van die Botrytis-rasse en Rhizopus het barnsteen-suur gevorm. Na 'n groeitydperk van vier maande het slegs ras M3(iii) 'n verdere toename van hierdie suur teweeggebring terwyl dit deur die ander rasse van B.cinerea en Rhizopus gedeeltelik gedissimileer is. Glikol-suur is ook deur al die rasse, uitgesonderd ras 73(i), gevorm en na vier maande is die suur totaal gedissimileer. B.cinerea bring groot afnames in die wynsteen- en appelsuurgehaltes van druiwemos teweeg. Rhizopus het prakties geen wynsteensuur gedissimileer nie, maar groot hoeveelhede appelsuur gevorm. Al die Botrytis-rasse, en Rhizopus by uitstek, het sitroensuur gevorm. Betreffende die hoeveelhede van die verskillende sure wat gevorm of afgebreek is, was daar op enkele uitsonderings na, by die verskillende Botrytis-rasse geen verskille in suurmetailisme nie.

8.

In ooreenstemming met die bevindinge van oorsese navorsers is bevestig dat B.cinerea ongeveer dieselfde mate van suur- en suikerverlies in moste teweegbring. Indien die besmetting van druiwe deur die betrokke skimmelswamme enige voordeel vir die Suid-Afrikaanse wynbereiding sou inhou, sou Rhizopus nigricans volgens hierdie resultate voordeliger wees, aangesien die swam die grootste hoeveelhede sitroensuur, appelsuur en gliserol vorm en minder wynsteensuur afbreek. Aangesien Rhizopus gewoonlik saam met B.cinerea op druiwe voorkom, ontstaan die vraag of Rhizopus nie in elk geval 'n bydrae lewer tot die sogenaamde "veredelings" van "Botrytis-rosyntjies" nie.

Aan die hand van die resultate wat in hierdie studie verkry is, mag dit voordelig wees om die ondersoek verder te voer deur wyne te berei van druiwe wat onder gekontroleerde toestande met B.cinerea sowel as R.nigricans geïnfekteer is. Afgesien hiervan, is daar egter ook nog ander aspekte van hierdie studieveld wat met voordeel intensiewer ondersoek kan word. In hierdie verband word veral gedink aan die vasstelling van die metaboliese produkte wat deur die betrokke organismes tydens die afbreek van b.v. gliserol, glukoon suur, appelsuur, wunsteensuur en selfs barnsteensuur gevorm word. Die produkte wat gevorm word, sowel as die metaboliese roetes wat gevolg word, sal moontlik deur die gebruik van kunsmatige voedingsmedia bepaal kan word. Die voedingstowwe wat ondersoek word, kan noukeurig beheer word. Hierdie navorsingsrigting sal in aansluiting met die aangeduide resultate 'n volledige beeld kan verskaf van die veranderinge wat deur die betrokke skimmels in druiwemos teweeggebring word.

LITERATUURVERWYSINGS.

- AMERINE, M.A., 1955. Laboratory procedures for enology, Davis, California: Univ. of Calif. Press (Mimeo)
- BARINOVA, S.A., 1960. Tricarboxylic acid cycle in fungi. *Mikrobiologiya*, 29, 21 - 26.
- BEHRENS, J., 1898. Beiträge zur Kenntnis der Obstfäulnis. *Centralbl. f. Bakt., Abtlg II*, 4, 514-520.
- BUCH, M.L., MONTGOMERY, R. & PORTER, W.L., 1952. Identification of organic acids on paper chromatograms. *Anal. Chem.*, 24, 489-491.
- BULEN, W.A., VARNER, J.E. & BURREL, R.C., 1952. Separation of organic acids from plant tissues. *Anal. Chem.*, 24, 187-190.
- BURROUGHS, L.F., 1957. The amino-acids of apple juices and ciders. *J. Sci. Food Agric.*, 8, 122-131.
- BUXTON, E.W., 1962. Parasexual recombination in the banana-wilt *Fusarium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 45, 274-279.
- CARLSON, S., 1960. Der Einfluss von niederen Wechselströmen auf die Biosynthese der Glukonsäure durch Aspergillus niger. *Arch. Mikrobiol.*, 37, 7-17.
- COLOMBO, P., CORBETTA, D., PIROTTA, A., RUFFINI, G. & SARTORI, A., 1960. A solvent for qualitative and quantitative determination of sugars using paper chromatography. *J. Chromatog.*, 3, 343-350.
- DITTRICH, H.H., 1964. Über die Glycerinbildung von Botrytis cinerea auf Traubenbeeren und Traubenmosten sowie über den Glyceringehalt von Beeren- und Trockenbeerenausleseweinen. *Die Wein-wissenschaft*, 19, 12-20.
- DU PLESSIS, S.J., 1936. Studies on the wastage of export grapes with special reference to that caused by Botrytis cinerea, Pers. Union S.A., Dept. Agric. and For., *Sc. Bull.*, No 151, 1-163.
- FINAR, I.L., 1959. *Organic Chemistry*, 3rd ed. London: Longmans Green & Co. Ltd.

- FOSTER, J.W., 1949. Chemical activities of fungi, New York, N.Y.: Academic Press Inc.
- FRANKE, W., JILGE, G. & EICHHORN, G., 1961. Zum Enzymatischen Umsatz von C₂-Säuren durch Mikroorganismen. Arch. Mikrobiol., I-III, 39, 58-100.
- FRUTON, J.S. & Simmonds, S., 1960. General Biochemistry, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc.
- GÄUMANN, E. & BÖHNI, E., 1947. Über adaptive Enzyme bei parasitischen Pilzen. Helvet. chim. Acta, 30, 24-38.
- GENTILE, A.C., 1954. Carbohydrate metabolism and oxalic acid synthesis by Botrytis cinerea. Plant Physiol., 29, 257-261.
- HAEHN, H., 1952. Biochemie der Gärungen. Berlin: Walter de Gruyter & Co.
- HANSEN, H.N. & Smith, R.E., 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi: Botrytis cinerea. Phytopatology, 12, 953-964.
- HARPER, H.A., 1963. Review of Physiological Chemistry. Los Altos, California: Lange Medical Publications.
- HULME, A.C., 1953. An action of strongly basic anion-exchange resins and solutions containing sugars. Nature, 171, 610.
- HULME, A.C. & WOOLTORTON, L.S.C., 1958. Determination and isolation of the non-volatile acids of pome fruits and a study of acid changes in apples during storage. J.Sci. Food Agric., 9, 150-158.

- JEFFERSON, W.E., FOSTER, J.W., PHARES, E.F. & CARSON, S.F., 1952.
Formate as a precursor of carboxylic acids in fungi.
J.amer.chem.Soc., 74, 1477.
- JÖRGENSEN, A., 1956. Mikroorganismen der Gärungsindustrie,
7.Aufl. Nürnberg: Verlag Hans Carl.
- KERTESZ, Z.I., 1951. The pectic substances, New York: Inter-
science Publishers.
- KIELHÖFER, E. & WÜRDIG, G., 1961. Über Vorkommen, Nachweis und
Bestimmung der Schleimsäure im Wein und Weintrub.
Z.Lebensmittelunters. u. Forsch., 115, 418-428.
- KOCH, J. & SCHWAHN, H., 1958. Papierelektrophoretische Unter-
suchungen der löslichen Traubenproteine. Z.Lebens-
mittelunters.u.Forsch., 107, 20.
- KOCKOVÁ-KRATOCHVILOVÁ, A. & VOJTKOVÁLEPŠÍKOVÁ, A., 1958. Eine
neue Art der Beurteilung der Assimilationsfähigkeit
der Hefe. Die Naturwissenschaften, 45, 473.
- KORNBERG, H.L. & KREBS, H.A., 1957. Synthesis of cell con-
stituents from C_2 -units by a modified tricarboxylic
acid cycle. Nature, 179, 988-991.
- LINSTEAD, R.P., ELVIDGE, J.A. & WHALLEY, M., 1955. Modern
techniques of organic chemistry, London: Butterworths
Scientific Publications.
- MARQUEZ, J.G. & LLAGUNO, C., 1958. Fumaric acid fermentation;
submerged culture and mechanisms of fumaric acid
fermentation. Rev.españ.fisiol., 14, 229-231. (Abst.
Chem.Abst., 54, 17787, 1960.)

- MEČÍŘ, R., 1946. Microbiological synthesis of fumaric acid. Chem.Listy, 40, 181-184. (Abst. Chem.Abst., 45, 3453, 1951.)
- MEYER, L.H., 1960. Food chemistry, New York: Reinhold.
- MÜHLBERGER, F.H. & GROHMANN, H., 1962. Über das Glyzerin in Traubenmosten und Weinen. Klosterneuburg Mitteilungen, A, 12, 260.
- MÜLLER-THURGAU, H., 1888. Die Edelfäule der Trauben. Landw.Jb., 17, 83-160.
- MÜLLER-THURGAU, H., 1895. Wirkung der Schimmelpilze bei der Fäulnis des Obstes. Z.f.Pflanzenkr., 5, 249.
- NEISH, A.C., 1950. Determination of glycerol and related compounds in fermentation solutions by partition chromatography. Can.J.Res., B 28, 535-540.
- NEISH, A.C., 1952. Analytical methods for bacterial fermentations. 2nd.rev. National Res.Council of Canada, NRC. No. 2952.
- NELSON, K.E., 1951. Some histological aspects of Botrytis-rot of table grapes. Phytopathology, 41, 941.
- NELSON, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem., 153, 375-380.
- NELSON, K.E. & AMERINE, M.A., 1957. The use of Botrytis cinerea Pers. in the production of sweet table wines. Hilgardia, 26, 521-563.

- *NELSON, K.E. & AMERINE, M.A., 1957 (a). Further studies on the production of natural sweet table wines from Botrytised grapes. *Am.J.Enol.&Vit.*, 8, 127-134.
- NOVÁK, E.K., 1958. Carbon metabolism in B.cinerea and its bearing on sweet rot in grapes. II. Utilization of malonic acid and its effect on the metabolism of the mold. *Ibid.*, 223-236. (Abst. *Chem.Abst.*, 54, 14359, 1960)
- NOVÁK, E.K. & VOROS-FELKAI, G., 1958. Carbon metabolism in B.cinerea and its bearing on sweet rot in grapes. I. Organic acids, the only carbon sources of the mold. *Acta Microbiol.Acad.Sci.Hung.*, 5, 217-221. (Abst. *Chem. Abst.*, 54, 14359, 1960)
- NYESTE, L. & HALLÓ, J., 1963. Untersuchungen über die Polygalakturonase-Enzyme aus Schimmelpilzen. *Fruchtsaft Industrie*, 8, 143-144.
- NYESTE, L., HALLÓ, J. & KOVÁKS, L., 1963. Untersuchungen über die Polygalakturonase-Enzyme aus Schimmelpilzen. *Fruchtsaft Industrie*, 8, 349.
- OLMSTED, W.H., WHITHAKER, W.M. & DUDEN, C.W., 1929. Steam distillation of the lower volatile fatty acids from a saturated salt solution. *J.Biol.Chem.*, 58, 109-114.
- OLSON, J.A., 1954. The d-isocitric lyase system: the formation of glyoxylic- and succinic acids from d-isocitric acid. *Nature*, 174, 695.
- OLSON, J.A., 1959. The purification and properties of yeast isocitric lyase. *J.Biol.Chem.*, 234, 5-10.
- PARTRIDGE, S.M., 1949. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. III. Fractionation of a protein hydrolysate. *Biochem.J.*, 44, 521-527.
- PEYNAUD, E., LAFOURCADE, S. & CHARPENTIÉ, Y., 1959. Recherches sur les transformations du raisin par B.cinerea. *Vignes et Vins*, 75, 6-8. (Abst. *Weinberg und Keller*, 6, 275-278, 1959)

- POLARD, F.H., NICKLESS, G. & BURTON, K.W.C., 1962. A spraying reagent for anions. *J.Chromatog.*, 8, 507-509.
- PRILLINGER, F., 1957. Über die Stickstoffhaltigen Substanzen im Wein. *Klosterneuburg Mitteilungen*, A 7, 138-147.
- RENTSCHLER, H. & TANNER, H., 1955. Über den Nachweis von Glukonsäure in Weinen aus edelfaulen Trauben. *Mitteilungen Leb.Hyg.*, 46, 200. (Abst. Klosterneuburg Mitteilungen, A 6, 146, 1956.)
- RENTSCHLER, H. & TANNER, H., 1955 (a). Über Weine aus edelfaulen Trauben. *Deutsche Weinzeitung*, 91, 30-32.
- RIBÉREAU-GAYON, G., 1960. Die Formen der Einwirkung der B.cinerea auf die Weinbeere. *Vitis*, 2, 113-116.
- RIBÉREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E., LAFOURCADE, S. & CHARPENTIÉ, Y., 1955. Recherches biochimiques sur les cultures de Botrytis cinerea. *Bull.Soc.Chim.biol.*, 37, 1055-1076. (Abst. Klosterneuburg Mitteilungen, A 7, 54, 1957.)
- SCHANDERL, H., 1959. *Handbuch der Kellerwirtschaft*, II. Die Mikrobiologie des Mostes und Weines, Stuttgart: Eugen Ulmer.
- SKINNER, C.E., EMMONS, C.W. & TSUCHIYA, H.M., 1951. *Molds yeasts and Actinomycetes*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- SOMOGYI, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J.Biol.Chem.*, 160, 61-68.
- STALDER, L., 1954. Untersuchungen über die Graufäule (B.cinerea) an Trauben. II. Über den Zucker- und Säureverbrauch des Pilzes und die Wirkung einiger Nährstoffe auf

das Wachstum. Phytopath. Z., 22,345-380.

VAN ZIJL, J.A., 1962. The microbiology of South African wine-making. II: The preservation of musts and wines with pyrocarbonic acid diethyl ester. S.Afr.J.Agric.Sci., 5, 293-304.

VOGT, E., 1958. Handbuch der Kellerwirtschaft, III. Weinchemie und Weinanalyse, 2.Auflage, Stuttgart: Eugen Ulmer.
