

pu faire valoir. Il ne commandait pas: il recommandait. Il n'interdisait point: il déconseillait. Et malgré cela c'était, indiscutablement, le patron qui parla. C'est ainsi qu'il fut appelé dans les laboratoires et que finalement il se désignait lui-même.

Sa capacité de travail était prodigieuse; il lisait énormément, rédigeait beaucoup, et d'une manière générale se dépensait sans compter. C'était pour lui une nécessité absolue: par son activité dans plusieurs domaines il était en contact personnel avec un très grand nombre de collègues et chaque fois qu'il entreprenait un voyage, il faisait de nouvelles connaissances qui, très souvent, devenaient de nouvelles amitiés. Aussi son courrier se gonflait au cours des années et une bonne partie de la matinée était utilisée à lire les lettres reçues et à dicter les réponses. Les fréquentes visites que lui rendirent ses collègues de Suisse ou d'étranger et qu'il reçut souvent dans sa belle propriété à Genthod, lui prirent encore du temps. A côté de cela, il était un grand admirateur de la nature, travaillait dans son jardin, s'intéressait à la peinture et à la musique classique.

C'est cet homme extraordinairement doué qui vient de s'éteindre à l'âge de 68 ans. Sa disparition est une irréparable perte dans tous les domaines où son activité débordante lui fit jouer un rôle de premier plan. C'est un très grand chagrin pour ses amis. Et pour ses proches un deuil si profond, inexprimable.

A. J. A. van der Wyk.

178. Über den enzymatischen Abbau von Pektinsäure und die Isolierung von Oligogalakturonsäuren

von **H. Altermatt** und **H. Deuel**.

(10. V. 52.)

Pektinase (Polygalakturonase), ein Enzym, das in Mikroorganismen, Pilzen und einzelnen Pflanzen vorkommt, vermag die glykosidischen Bindungen von Pektinstoffen aufzuspalten¹⁾. Je nach Herkunft des Enzyms erfolgt dieser Pektinabbau partiell²⁾ oder vollständig zu Galakturonsäure³⁾, wobei die Geschwindigkeit und der Mechanismus der Reaktion (Spaltung der glykosidischen Bindungen der Fadenmolekel statistisch oder von den Enden her) in verschiedener Weise vom Veresterungsgrad des Pektins abhängig sind⁴⁾. Der Abbau kann durch Bestimmung der Abnahme der Viskosität der Lösung,

¹⁾ Vgl. *Z. I. Kertesz*, *The Pectic Substances*. Interscience Publ., New York 1951, S. 333ff.

²⁾ *B. S. Luh & H. J. Phaff*, *Arch. Biochem.* **33**, 212 (1951).

³⁾ *H. S. Isbell & H. L. Frush*, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **32**, 77 (1944).

⁴⁾ *E. F. Jansen & L. R. Macdonnell*, *Arch. Biochem.* **8**, 97 (1945); *J. Matus*, *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **58**, 319 (1948); *C. G. Seegmüller & E. F. Jansen*, *J. Biol. Chem.* **195**, 327 (1952).

Abnahme der Flockbarkeit und des Geliervermögens der Pektinstoffe sowie der Zunahme an Aldehydendgruppen erfasst werden. Die Bildung niedermolekularer Bruchstücke ist papierchromatographisch¹⁾ sowie durch Adsorption an Ionenaustauschern²⁾ verfolgt worden. Ältere Arbeiten über eine Isolierung niedermolekularer Bruchstücke durch Einwirkung von Salzsäure auf Pektin (Digalakturonsäure³⁾ und Tetragalakturonsäure⁴⁾) fanden keine Bestätigung. Neuestens ist eine Reindarstellung von Di- und Trigalakturonsäure aus einer mit Hefepektinase behandelten Pektinsäurelösung beschrieben worden⁵⁾. Hefepektinase vermag Pektinstoffe nur partiell abzubauen⁶⁾.

In der vorliegenden Arbeit wird der vollständige Abbau von Pektinsäure (Polygalakturonsäure) mit einer Pektinase⁷⁾ aus Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* beschrieben. Dabei wurde, unabhängig von den oben zitierten Autoren, aus den partiell abgebauten Lösungen Di- und Trigalakturonsäure isoliert.

Tabelle 1.

Enzymatischer Abbau von Pektinsäure.

Dauer des Abbaues in Std.	Viskosität η spez.	End-Aldehydgruppen %	Flockbarkeit mit		Papierchromatographische Analyse Poly-, Penta-, Tetra-, Tri-, Di-, Mono-Galakturonsäure					
			CuSO ₄	CH ₃ OH						
0	3,0	0	++	++	+	-	-	-	-	-
0,25	1,76	—	++	++	+	-	-	-	-	-
0,5	1,16	—	++	++	+	-	-	-	-	-
0,75	0,78	—	++	++	+	-	-	-	-	-
1	0,56	5	++	++	+	+	(+)	-	-	-
1,5	0,36	7,5	++	++	+	+	+	-	-	-
2	0,22	11	++	++	+	+	+	+	-	-
2,5	0,16	12,5	+	++	+	+	+	+	(+)	(+)
3	0,06	17,5	(+)	+	+	+	+	+	(+)	(+)
4	0,01	20	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)
6	0,00	32,5	-	(+)	-	+	+	+	+	(+)
8	0,00	37,5	-	-	-	-	+	+	+	+
24	0,00	39,5	-	-	-	-	(+)	+	+	+
72	0,00	90	-	-	-	-	-	+	+	+
96	0,00	93	-	-	-	-	-	(+)	+	+
120	0,00	95	-	-	-	-	-	-	+	+

1) M. A. Jermyn & R. G. Tomkins, *Biochem. J.* **47**, 437 (1950); W. W. Reid, *J. Sci. Food Agr.* **1950**, 234.

2) H. Deuel, J. Solms & L. Anyas-Weisz, *Helv.* **33**, 2172 (1950).

3) F. Ehrlich & R. v. Sommerfeld, *Bioch. Z.* **168**, 263 (1926).

4) F. Ehrlich in E. Aberhalden, *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden I*, 11, S. 1503 (1936).

5) H. J. Phaff & B. S. Luh, *Arch. Biochem.* **36**, 231 (1952).

6) B. S. Luh & H. J. Phaff, *Arch. Biochem.* **33**, 212 (1951).

7) Die Pektinase, ein Handelsprodukt der Firma *Takamine, Laboratory Inc.*, Clifton, N. J., U.S.A., wurde in freundlicher Weise von Herrn Dr. F. Weber, Künsnacht, zur Verfügung gestellt.

Der enzymatische Abbau einer partiell neutralisierten 1-proz. Pektinsäurelösung (pH 4) wurde während 120 Std. bei 30° verfolgt (Tab. 1).

Nach einstündiger Reaktionsdauer konnte eine Abnahme der Viskosität auf etwa ein Fünftel des Ausgangswertes beobachtet werden. Aldehydgruppen und Flockbarkeit zeigten keine wesentliche Änderung. Auf dem Papierechromatogramm konnten Poly- bis Pentagalakturonsäuren, aber im Gegensatz zum Befund anderer Autoren¹⁾ keine Tetra- bis Monogalakturonsäuren nachgewiesen werden. Nach 4 Std. war die Viskosität auf den Wasserwert gesunken. Hochmolekulare Bruchstücke konnten nicht mehr ausgefällt werden. Die Aldehydgruppen hatten um 20% zugenommen. Papierchromatographisch konnten nur noch Spuren Polygalakturonsäure, reichlich Penta- bis Digalakturonsäure und bereits etwas Monogalakturonsäure nachgewiesen werden. Nach 120 Std. betrug die relative Aldehydgruppenzunahme 95%. Papierchromatographisch konnte nur noch wenig Di- und viel Monogalakturonsäure erkannt werden. Diese Daten, ganz besonders das Fehlen von Monogalakturonsäure in den ersten Std. des Abbaues, zeigen das statistische Erfolgen des Angriffs der Pektinsäurefadenmolekel durch Pektinase.

Nach 120 Std. Abbau konnte neben Monogalakturonsäure (als Na-Sr-Doppelsalz) und Spuren von L-Arabinose und D-Galaktose das Na-Sr-Salz einer Uronsäure isoliert werden, die als Digalakturonsäure identifiziert werden konnte (Tab. 2).

Nach 25stündiger Enzymeinwirkung bei 37° konnte neben Mono- und Digalakturonsäure (Na-Sr-Salze) und Spuren von L-Arabinose und D-Galaktose das Na-Sr-Salz einer weiteren Uronsäure, der Trigalakturonsäure, isoliert werden. (Tab. 2.)

Tabelle 2.

Charakterisierung von Mono-, Di- und Trigalakturonsäure.

	Monogalakturonsäuremonohydrat		Digalakturonsäuremonohydrat		Trigalakturonsäuremonohydrat	
	gef. %	ber. %	gef. %	ber. %	gef. %	ber. %
Mikroanalysen . .						
C	33,97	33,98	37,12	37,28	38,30	38,41
H	5,70	5,78	5,19	5,23	5,00	5,07
COOH/CHO . . .	0,99		1,98		3,05	
Smp.	160° Zers.		130° Beginn d. Zers.		150° Beginn d. Zers.	
R _A -Wert (bez. auf Galakturonsäure)	1,00		0,42		0,18	

¹⁾ M. A. Jermyn & R. G. Tomkins, Biochem. J. **47**, 437 (1950).

Experimenteller Teil.

1. Herstellung und Reinigung von Pektinsäure. 500 g Handelspektin¹⁾ wurden in alkalischem Isopropanol (7 l Alkohol, 200 g NaOH) während 24 Std. heterogen verseift und mit 3 l Salzsäurealkohol (3% HCl) ausgewaschen. Anschliessend wurden 8 l Wasser zugesetzt und bei pH 4 mit Na-chlorit (10 g) während 24 Std. gebleicht. Die gebleichte Pektinsäure wurde in 20 l Wasser unter Neutralisation mit NaOH gelöst und mit HCl gefällt. Der Niederschlag wurde viermal mit je 2 l 3-proz. alkoholischer Salzsäure und anschliessend mit reinem Alkohol chlorfrei gewaschen und im Vakuum bei 70° getrocknet.

2. Enzymatischer Abbau. Pektinsäure wurde durch partielle Neutralisation mit NaOH (pH 4) in 1-proz. Konzentration gelöst und mit 20% trockenem Enzympräparat, bezogen auf Pektinsäure, versetzt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen.

3. Verfolgung des enzymatischen Abbaues. Die *Viskositäten* wurden ohne Zusätze direkt an der Untersuchungslösung mit einem *Ubbelohde*-Viskosimeter bei 30° gemessen. Die *Aldehyd-Endgruppen* wurden nach kurzem Aufkochen der Proben durch Oxydation mit alkalischer Hypojoditlösung²⁾ bestimmt. Dabei wurde die Zunahme der Aldehyd-Endgruppen, bezogen auf die Gesamtmenge an Uronsäurebausteinen, in Prozent berechnet und als Aldehydprozent bezeichnet. Die *Flockbarkeit* wurde an den Lösungen durch Zusatz gleicher Mengen an 1-n. CuSO₄-Lösung resp. reinem Methanol und Beobachtung nach 10 Min. geprüft. Für die *papierchromatographischen Untersuchungen*³⁾ wurden die Proben kurz erhitzt, 48 Std. bei 20° mit wassergesättigter Isobuttersäure über *Whatman*-Papier Nr. 4 perkoliert und mit ammoniakalischer Silbernitratlösung entwickelt. Die R_A-Werte wurden durch Vergleich der Laufstrecken der einzelnen Uronsäuren mit der Monogalakturonsäure (gleich 1) errechnet.

4. Isolierung von Digalakturonsäure. 1 l während 120 Std. bei 30° enzymatisch abgebauter Lösung wurde mit Aktivkohle und Kieselgur versetzt, aufgekocht und heiss filtriert. Das Filtrat wurde über 100 cm³ Dowex-50 (H-Form) perkoliert, im Vakuum bei 40° auf 250 cm³ eingedampft, in 750 cm³ Äthanol gegossen, erneut filtriert und zur Trockene im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 cm³ Wasser aufgenommen, mit 0,5-n. NaOH zu genau einem Drittel neutralisiert, mit SrCO₃ im Überschuss versetzt, erwärmt, filtriert und auf 50 cm³ eingeeengt. Bei 0° kristallisierte während 48 Std. das Na-Sr-Salz der Monogalakturonsäure aus. Die Mutterlauge, die vor allem Digalakturonsäure enthielt, wurde mit 3 l 90-proz. Äthanol versetzt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und mehrmals, bis papierchromatographisch nur noch eine Komponente nachweisbar war, durch Lösen in Wasser und Fällung mit Äthanol gereinigt. Der reine Niederschlag (2,4 g) wurde in Wasser gelöst, über 100 cm³ Dowex-50 (H-Form) perkoliert und die Lösung im Vakuum auf wenige cm³ eingedampft. Nun wurden wiederholt 96-proz. und absoluter Alkohol zugegeben und eingeeengt. Es kristallisierten 1,3 g Digalakturonsäure aus, die abfiltriert und mit abs. Äther nachgewaschen wurden. Zur Charakterisierung wurden an je 0,2 g Digalakturonsäure die Carboxylgruppen durch Titration mit 0,1-n. NaOH und die Aldehydgruppen nach *Willstätter-Schudel* bestimmt.

5. Isolierung von Trigalakturonsäure. 1 l während 25 Std. bei 37° enzymatisch abgebauter Lösung wurde wie oben beschrieben behandelt (Reinigung, Auskristallisation des Na-Sr-Salzes der Monogalakturonsäure). Die Mutterlauge, die vor allem Di- und Trigalakturonsäure enthielt, wurde bis zu einer Konzentration von 40% mit Äthanol versetzt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und mehrmals, bis

¹⁾ Wir danken der Firma *Unipektin A.G.*, Zürich, für die freundliche Überlassung von Pektin.

²⁾ *R. Willstätter & G. Schudel*, B. **51**, 780 (1918).

³⁾ *M. A. Jermyn & R. G. Tomkins*, Biochem. J. **47**, 437 (1950).

papierchromatographisch nur noch eine Komponente nachweisbar war, durch Lösen in Wasser und Fällung mit Äthanol (Endkonzentration 40%) gereinigt. Der reine Niederschlag wurde in wenig Wasser gelöst und über 100 cm³ Dowex-50 (H-Form) perkoliert. Die Lösung wurde am Vakuum auf wenige cm³ eingedampft, in viel Äthanol aufgenommen und erneut eingengt, wobei Trigalakturonsäure als weisses Pulver ausfiel. Nach Filtration und Auswaschen mit abs. Äther wurden 3,0 g reine Trigalakturonsäure erhalten. Zur Charakterisierung wurden an je 0,3 g die Carboxylgruppen und die Aldehydgruppen wie unter 4 bestimmt.

Herrn Dr. *J. Solms* danken wir für wertvolle Mitarbeit. Die Mikroanalysen wurden von Herrn *A. Peisker*, Mikroanalytisches Laboratorium, Brugg, ausgeführt. — Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel der *Arbeitsbeschaffungskredite des Bundes* ermöglicht. Wir danken bestens für die Unterstützung.

Zusammenfassung.

Der Abbau von partiell neutralisierter Pektinsäure durch eine Pektinase aus Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* wurde nach üblichen Methoden sowie papierchromatographisch verfolgt. Der Angriff des Enzyms auf die Fadenmolekel erfolgt statistisch.

Aus den partiell abgebauten Lösungen konnten Digalakturonsäure und Trigalakturonsäure rein isoliert werden.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

179. 4,6-Ditosyl-2-desoxy- α -methyl-D-allosid.

Desoxy-zucker, 28. Mitteilung¹⁾

von **H. R. Bolliger** und **M. Thürkaf**.

(10. V. 52.)

Vor kurzem¹⁾ wurde die Reduktion von 4,6-Ditosyl-2,3-anhydro- α -methyl-D-allosid (I)¹⁾²⁾ mit Lithiumaluminiumhydrid beschrieben, die je nach den gewählten Bedingungen eine einfache Synthese von Digitoxose (IV) oder Cymarose (V) erlaubt. Dabei wurde beobachtet, dass die beiden Tosylgruppen in I verschieden³⁾ und verschieden schnell¹⁾ reagieren.

Wird die Reduktion von I mit Lithiumaluminiumhydrid unter sehr milden Bedingungen durchgeführt, so tritt erwartungsgemäss fast ausschliesslich reduktive Spaltung des Anhydrorings unter Bildung von 4,6-Ditosyl-2-desoxy- α -methyl-D-allosid (II) ein. Die Reak-

¹⁾ 27. Mitt.: *H. R. Bolliger & P. Ulrich*, *Helv.* **35**, 93 (1952).

²⁾ *M. Gut & D. A. Prins*, *Helv.* **30**, 1223 (1947).

³⁾ *H. Schmid & P. Karrer*, *Helv.* **32**, 1371 (1949).