

45 Std. bei 30° unter Rühren gehalten, dann kalt abgesaugt, mit Benzol nachgewaschen und getrocknet. Derart wurden 168,9 g (84,8% d.Th.) der Additionsverbindung vom Smp. 144,5–146,5° in schneeweissen Kristallen erhalten. Für die Analyse wurde aus der zehnfachen Menge Dioxan umkristallisiert und bei 100° über Phosphorpentoxyd im Vakuum getrocknet. Smp. 148–149°.

$C_{34}H_{44}O_8N_6S_4$ Ber. C 51,48 H 5,60 N 10,60 S 16,18% Mol.-Gew. 792,8
 Gef. „ 51,53 „ 5,60 „ 10,24 „ 16,40% „ „ 770 ($\pm 10\%$)

Hexamin I aus VI: 422 g des aus Dioxan umkristallisierten Adduktes wurden in einer Mischung von 160 ml Wasser und 635 g konz. reiner Schwefelsäure durch 7stündiges Erwärmen auf 150° unter gutem Rühren verseift. Nach dem Erkalten bilden sich zwei Schichten, von denen die eine bisweilen erstarrt. Es wurde vorsichtig mit 400 ml Wasser versetzt und dann mit NaOH stark alkalisch gemacht. Da sich das Amin meist nicht an der Oberfläche des Salzbreies ausscheidet, wurde nun im Vakuum weitgehend eingedampft und die Salzmasse mit gekühltem Alkohol mehrmals ausgezogen. Das Natriumsalz der Benzolsulfosäure wird dabei auch gelöst, fällt aber beim Abkühlen der Extrakte auf –20° weitgehend wieder aus. Es wurde abgekühlt, filtriert, der Alkohol entfernt und der Rückstand im Hochvakuum destilliert. Das reine Hexamin stellt eine farblose, ölige Flüssigkeit dar, Sdp. 139–143°/0,06 mm, $n_D^{20} = 1,5104$.

$C_{10}H_{28}N_6$ (232,4) Ber. N 36,18% Gef. N 36,34; 36,04%

Beim Einleiten von HCl in die alkoholische Lösung des Hexamins entsteht das oben beschriebene Pentahydrochlorid.

SUMMARY.

Two methods are described for the preparation of the hexamine of formula I:

1. Condensation of bis-(phtalimido-ethyl)-amine (III) with 1,2-dibromoethan and hydrolysis of the product.

2. Condensation of benzenesulfoethylene-imide (V) with ethylenediamine and saponification in H_2SO_4 .

The hexamine was, however, not obtained by hydrogenation of ethylene-diamine-tetraaceto-nitril (II).

Leverkusen, *Bayer-Werk*,
 Zürich, Chemisches Institut der Universität.

293. Über den Mechanismus des enzymatischen Abbaues von Pektinstoffen verschiedenen Veresterungsgrades

von J. Solms, H. Deuel und L. Anyas-Weisz.

(10. X. 52.)

Das die glykosidischen Bindungen von Pektinstoffen hydrolysierende Enzym Pektinase¹⁾ (Polygalakturonase) kommt in Mikroorganismen, Pilzen und höheren Pflanzen vor, meist in Begleitung von anderen Enzymen, wobei vor allem Pektase, welche die Methoxylgruppen der Pektinstoffe abzuspalten vermag, von Bedeutung ist. Pektinasepräparate weisen je nach Herkunft verschiedene Eigenschaften auf und enthalten mög-

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

licherweise mehrere Komponenten¹). Pektinase greift vor allem Pektinsäure und niederveresterte Pektine an²), doch sind auch Präparate beschrieben worden, die hochveresterte Pektine bevorzugt abbauen³). Der Abbau kann partiell zu Oligogalakturonsäuren⁴) oder vollständig zu Galakturonsäure⁵) erfolgen. Auch der Mechanismus des Abbaues kann variieren. Aus den Beziehungen zwischen Viskositätsabnahme und Endgruppenzunahme von Abbaulösungen verschiedener Pektine zeigte sich, dass hochveresterte Pektine scheinbar bevorzugt vom Rande der Kettenmolekeln her, niederveresterte dagegen eher statistisch angegriffen werden⁶). Doch konnten entsprechende Bruchstücke bisher nicht direkt nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird der Mechanismus des Abbaues von Pektinstoffen verschiedenen Veresterungsgrades (64,5 % und 0 %) mit einer hochgereinigten Pektinase aus Schimmelpilzen⁷) untersucht. Der Umfang des Abbaues wurde durch Bestimmung der Aldehydengruppen verfolgt. Diese nehmen proportional der Anzahl der hydrolysierten glykosidischen Bindungen zu. Die Bildung niedermolekularer Bruchstücke wurde direkt papierchromatographisch sowie durch Adsorption an Ionenaustauschern verfolgt.

Die Daten in Tab. 1 zeigen, dass zu 64,5 % verestertes Pektin bedeutend langsamer als die keine Estergruppen aufweisende Pektinsäure angegriffen wird. In der Abbaulösung des Pektins konnten in den ersten 7 Std. des Abbaues nur Mono- und Digalakturonsäure und erst mit fortschreitender Reaktion (nach 96 Std.) Mono- bis Pentagalakturonsäuren papierchromatisch nachgewiesen werden. Der Abbau erfolgt hier eindeutig bevorzugt vom Rande der Kettenmolekel her. In der Abbaulösung der Pektinsäure konnten in den ersten 4 Std. keine Mono-, wenig Di- und Trimere und vor allem Tetra- und Pentamere nachgewiesen werden. Erst mit fortgeschrittener Reaktion, etwa nach 24 Std., wurden Monomere erkannt.

¹) R. J. McColloch & Z. I. Kertesz, Arch. Biochem. **17**, 197 (1948); W. W. Reid, Nature **166**, 76 (1950); J. Sci. Food Agr. **1950**, 234; E. Schubert, Nature **169**, 931 (1952).

²) S. A. Waksman & M. C. Allen, Am. Soc. **55**, 3408 (1933); E. F. Jansen & L. R. MacDonnel, Arch. Biochem. **8**, 97 (1945); E. F. Jansen, L. R. MacDonnel & R. Jang, Arch. Biochem. **8**, 113 (1945); H. Pallmann, J. Matus, H. Deuel & F. Weber, R. **65**, 633 (1946); H. Deuel, Helv. **30**, 1523 (1947).

³) R. K. S. Wood, Nature **167**, 771 (1951); C. G. Seegmiller & E. F. Jansen, J. Biol. Chem. **195**, 327 (1952); E. Roboz, R. W. Barratt & E. L. Tatum, J. Biol. Chem. **195**, 459 (1952).

⁴) R. J. McColloch & Z. I. Kertesz, Arch. Biochem. **17**, 197 (1948); G. H. Beaven & F. Brown, Biochem. J. **45**, 221 (1949); W. W. Reid, Nature **166**, 76 (1950); Biochem. J. **50**, 289 (1951); B. S. Luh & H. J. Phaff, Arch. Biochem. **33**, 212 (1951); E. Roboz, R. W. Barratt & E. L. Tatum, J. Biol. Chem. **195**, 459 (1952); H. Altermatt & H. Deuel, Helv. **35**, 1422 (1952).

⁵) F. Ehrlich, Bioch. Z. **251**, 204 (1932); H. L. Mottern & H. L. Cole, Am. Soc. **61**, 2701 (1939); E. Rietz & W. D. Maclay, Am. Soc. **65**, 1242 (1943); H. S. Isbell & H. L. Frush, J. Res. Nat. Bur. Stand. **33**, 389 (1944); H. Lineveaver, R. Jang & E. F. Jansen, Arch. Biochem. **20**, 137 (1949).

⁶) J. Matus, Ber. Schweiz. Bot. Ges. **58**, 319 (1948).

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

Der Abbau erfolgt hier statistisch. — Diesen Beobachtungen entspricht die Adsorption der Bruchstücke an Anionenaustauschern. Ionenaustauscher adsorbieren bekanntlich bevorzugt Mono- bis Trigalakturonsäuren und kaum höherpolymere Uronsäuren¹⁾. In Fig. 1

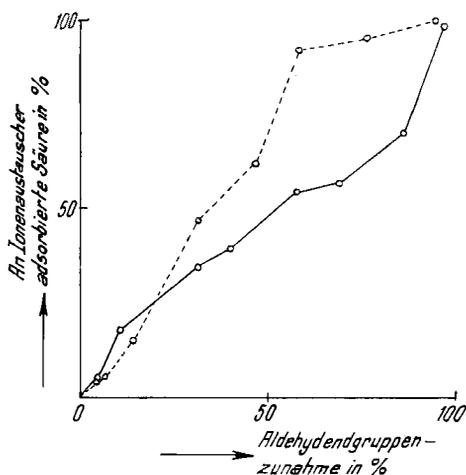


Fig. 1.

Adsorption enzymatisch abgebauter Pektinstoffe verschiedenen Veresterungsgrades an Anionenaustauschern.

- Pektin (Veresterungsgrad 64,5%)
 - - - - Pektinsäure (Veresterungsgrad 0%)

sind die Daten betr. Aldehydendgruppenzunahme und am Anionenaustauscher adsorbierte Säure einander gegenübergestellt. Bei gleicher Endgruppenzunahme wird deutlich eine unterschiedliche Adsorption der Bruchstücke festgestellt. Bei geringem Abbau vom Pektin wird vor allem monomere Galakturonsäure freigesetzt, während ein hochmolekularer Rest der Fadenmolekel zurückbleibt. Daher kann hier von Anfang an eine Adsorption festgestellt werden, die ständig dem Abbaugrad etwa proportional ist. Bei einem mittleren Abbau, Endgruppenzunahme ca. 58%, werden 54,8% der Uronsäuren adsorbiert. — Aus Pektinsäure wird in den ersten Std. des Abbaues wenig monomere Galakturonsäure freigesetzt. Die Adsorption von Bruchstücken ist daher bei gleichem Umfange des Abbaues geringer als bei Pektin. Mit fortgeschrittener Reaktion erfolgt jedoch ein gleichmässiger Kettenabbau zu niedermolekularen, adsorbierbaren Oligouronsäuren, mit entsprechend starkem Anstieg der Adsorption. Bei einem mittleren Abbau, Endgruppenzunahme etwa 58%, beträgt hier die Adsorption 91,9%.

Der Mechanismus des enzymatischen Abbaues von Pektinstoffen durch das verwendete Pektinasepräparat aus Schimmel-

¹⁾ H. Deuel, J. Solms & L. Anyas-Weisz, *Helv.* **33**, 2171 (1950).

Tabelle 1.
Enzymatischer Abbau von Pektinstoffen verschiedenen Veresterungsgrades.

Dauer des Abbaues	Pektin (zu 64,5% mit Methanol verestert)					Pektinsäure (nicht verestert)								
	Papierchromatographische Analyse der Galakturonsäuren					Papierchromatographische Analyse der Galakturonsäuren					Aldehyd- end- gruppen Zunahme in %	An Ionen- aus- taucher adsorb. Säure in %		
	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Poly-	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-	Penta-	Poly-	Aldehyd- end- gruppen Zunahme in %	An Ionen- aus- taucher adsorb. Säure in %
5 Min.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	4,60	4,71
15 Min.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	6,03	5,46
70 Min.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(+)	-	+	13,95	14,9
4 Std.	-	-	-	-	-	+	-	-	(+)	+	+	+	31,60	46,7
7 Std.	(+)	(+)	-	-	-	+	(+)	+	(+)	+	-	(+)	46,20	61,8
24 Std.	+	+	(+)	-	-	+	+	+	+	-	-	-	58,60	91,9
48 Std.	+	+	(+)	(+)	-	+	+	+	(+)	-	-	-	76,70	94,7
96 Std.	+	+	-	(+)	(+)	+	+	+	+	-	-	-	95,00	100,0
164 Std.	+	+	-	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-	-		
250 Std.	+	+	-	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-	-		

pilzen ist somit eindeutig vom Veresterungsgrad des Pektins abhängig. Es kann jedoch nicht ohne weiteres abgeklärt werden, ob eine einzige Enzymkomponente je nach Substrat verschiedene Abbau-mechanismen aufweist oder ob das Präparat zwei Enzymkomponenten umfasst, von denen eine hochverestertes Pektin langsam und vom Rande her abbaut, während die andere niederverestertes Pektin rasch und statistisch angreift.

Experimenteller Teil.

1. Herstellung der Ausgangslösungen: Ca. 8 g hochgereinigtes Pektin, zu 64,5% mit Methanol verestert, wurden in 400 cm³ Wasser gelöst und mit 100 cm³ Acetatpuffer (pH 3,9) versetzt. — Ca. 8 g hochgereinigte Pektinsäure wurden zu einem Drittel mit NaOH neutralisiert, in 400 cm³ Wasser gelöst und mit 100 cm³ Acetatpuffer (pH 3,9) versetzt¹). — 30 g Pektinase wurden in 300 cm³ Wasser gelöst und zur Reinigung von Pektase über je 900 cm³ Dowex-50 (H-Form) und Dowex-2 (OH-Form) im Gemischtbett perkoliert²).

2. Enzymatischer Abbau: Je 400 cm³ der Pektin- bzw. Pektinsäurelösungen wurden bei Zimmertemperatur mit 100 cm³ der Enzymlösung versetzt. Zu verschiedenen Zeiten wurden den Abbaulösungen je 50 cm³ entnommen, zur Inaktivierung des Enzyms und zur Verseifung der Estergruppen mit 40 cm³ 0,25-n. NaOH versetzt und nach 30 Min. auf 100 cm³ aufgefüllt.

3. Verfolgung des enzymatischen Abbaues: Für die papierchromatographischen Untersuchungen wurden die Proben mit wassergesättigter Isobuttersäure über *Whatman*-Papier Nr. 4 perkoliert und mit ammoniakalischer Silbernitratlösung entwickelt³). — An je 20 cm³ Lösung wurde nach Neutralisation die Zunahme der Aldehydendgruppen durch Oxydation mit alkalischer Hypojoditlösung⁴) bestimmt. Dabei wurde die Zunahme der Aldehydendgruppen, bezogen auf die Gesamtmenge an Uronsäurebausteinen, in Prozent berechnet. — Für die Adsorptionsversuche wurden je 20 cm³ Lösung über je 50 cm³ Dowex-50 (H-Form) und Dowex-2 (OH-Form) perkoliert, mit 150 cm³ Wasser nachgewaschen und gegen Phenolphthalein titriert. Die Abnahme der Carboxylgruppen nach der Perkolation wurde in Prozent des Gesamtgehaltes berechnet.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel aus dem *Weinbaufonds des Eidgenössischen Volkswirtschaftsdepartementes* ermöglicht. Wir danken bestens für diese Unterstützung.

Zusammenfassung.

Pektinstoffe verschiedenen Veresterungsgrades werden durch Pektinase aus Schimmelpilzen in verschiedener Weise abgebaut. Der enzymatische Abbau wurde papierchromatographisch, durch Endgruppenbestimmungen und durch Adsorption der Oligogalakturonsäuren an Anionenaustauschern verfolgt. Die Makromolekeln der hochveresterten Pektine werden vor allem vom Rande her, die der Pektinsäure dagegen statistisch hydrolysiert.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

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

²) *L. Anyas-Weisz*, Exper. (im Druck).

³) *M. A. Jermyn & R. G. Tomkins*, Biochem. J. **47**, 437 (1950); *H. Altermatt & H. Deuel*, Helv. **35**, 1422 (1952).

⁴) *R. Willstätter & G. Schudel*, B. **51**, 780 (1918).