

ZUSAMMENFASSUNG

Cholestanon-(1) (V) lieferte bei der Bromierung 2α -Bromcholestanon-(1) (IX) (Hauptprodukt) sowie 2β -Bromcholestanon-(1) (VI) und 2,2-Dibromcholestanon-(1) (VII). Bei der Behandlung von IX mit Alkoholat-Ionen wurde keine Ringkontraktion nach FAWORSKI, sondern Substitution von Br durch OH unter Bildung von 2α - und 2β -Hydroxycholestanon-(1) (XI bzw. VIII) sowie Oxydation zur 1,2-Secosäure XIII beobachtet.

Bromierung von 4,4-Dimethylcholestanon-(3) (XXI), einem strukturellen Analogon von V, ergab 2α -Brom-4,4-dimethylcholestanon-(3) (XXII) und das geminale Dibromid XXIII. Die Behandlung von XXII mit Methylat-Ionen führte zu 2α - bzw. 2β -Methoxy-4,4-dimethylcholestanon-(3) (XXVI bzw. XXV) sowie zu 4,4-Dimethylcholestandion-(2,3) (XXVII). Auch hier bildete sich kein FAWORSKI-Ester. Das gleiche Diosphenol XXVII wurde durch SeO_2 -Oxydation von XXI erhalten.

Alle Produkte wurden durch UV.- und IR.-Spektren sowie durch Rotationsdispersionskurven charakterisiert und die Stereochemie aus diesen Daten abgeleitet. Das Verhalten der Bromketone IX und XXII entspricht dem LOFTFIELD-Mechanismus der FAWORSKI-Reaktion; sie erfuhren weder eine Pinakolin-Umlagerung noch folgten sie einer «Push-Pull-Reaktion».

A-nor-Cholestanon-(1) (XV) wurde schliesslich durch Pyrolyse des Anhydrids der 1,2-Secosäure XIII erhalten. Seine optischen und chemischen Eigenschaften wurden mit denen der bekannten A-nor-Ketone, 17-Ketone, Cholestanon-(1) (V), sowie der 17a-Keto-D-homosteroide verglichen.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel, und
Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

173. Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbauendes Enzym

von P. Albersheim¹⁾, H. Neukom und H. Deuel

(4. VI. 60)

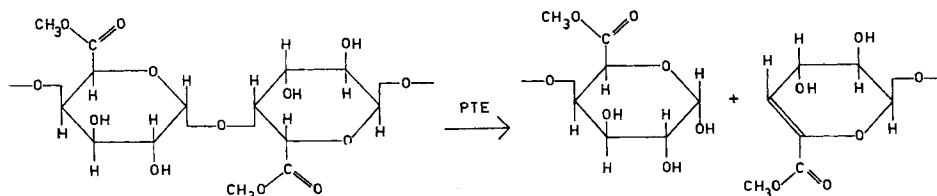
Pektinabbauende Enzyme, Polygalakturonasen, werden besonders von zahlreichen Mikroorganismen gebildet²⁾. Die verschiedenen bisher beschriebenen Polygalakturonasen sind spezifische Hydrolasen, die die α -1,4'-glykosidischen Bindungen der Pektinmakromolekeln hydrolytisch spalten. Die Endprodukte der Spaltung sind dabei Galakturonsäure oder Oligomere der Galakturonsäure. Im folgenden soll über ein pektinspaltendes Enzym berichtet werden, das Pektin nach einem anderen Mechanismus abbaut. Es wurde dazu ein kommerzielles Enzympräparat verwendet,

¹⁾ Gegenwärtige Adresse: Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge, Mass., USA.

²⁾ H. DEUEL & E. STUTZ, *Adv. Enzymology* 20, 341 (1958).

das als PECTASIN R-10³⁾ im Handel ist und für den Abbau des Pektins in Fruchtsäften Verwendung findet. Nach den bisherigen Untersuchungen der Spaltprodukte entspricht die Wirkung dieses Enzyms einer *trans*-Elimination (s. Formelschema), wie sie beim Abbau des Pektins bei neutraler⁴⁾ oder alkalischer Reaktion⁵⁾ beobachtet wurde. Dieses Enzym soll daher vorläufig als Pektin-*trans*-Eliminase bezeichnet werden. Bekannte Enzyme mit ähnlicher Wirkungsweise sind unseres Wissens nur gewisse bakterielle Hyaluronidasen, die Hyaluronsäure und Chondroitin unter Bildung von ungesättigten Aldobiouronsäuren abbauen⁶⁾.

Möglicher Mechanismus der Spaltung der Pektinkette durch Pektin-trans-Eliminase (PTE)



PECTASIN R-10 ist ein besonders hitzestabiles Enzympräparat. Nach einstündigem Erwärmen auf 50° in Gegenwart des Substrates behält es seine pektinspaltende Wirkung vollständig bei, nach 20 Minuten bei 60° verliert es nur 24% seiner Aktivität⁷⁾. Aus den bisherigen Beobachtungen darf angenommen werden, dass Pektin-*trans*-Eliminase aus Pektin Abbauprodukte bildet, die am nicht-reduzierenden Ende eine Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 des Galakturonsäurebausteines besitzen (s. Formeln). Die Doppelbindung steht in α -Stellung zur Methylestergruppe und bewirkt eine starke UV.-Absorption bei 235 m μ . Durch Messung der Zunahme dieser Absorption kann daher die Wirkung der Pektin-*trans*-Eliminase leicht verfolgt werden. Fig. 1 zeigt die Änderung der Absorption bei 235 m μ , die durch Behandlung einer Pektinlösung mit PECTASIN R-10 beobachtet wird. Zum Vergleich wurde ein anderes kommerzielles Polygalakturonasepräparat, PECTINASE⁸⁾, untersucht, das nur eine sehr geringe Pektin-*trans*-Eliminase-Aktivität besitzt und Pektin auf rein hydrolytische Weise abbaut. Eine gereinigte Polygalakturonase⁹⁾ ergab keine Zunahme der UV.-Absorption.

Zur Bestimmung des pH-Optimums der Pektin-*trans*-Eliminase wurde eine Pektinlösung bei verschiedenen pH-Werten mit PECTASIN R-10 behandelt und die Absorption bei 235 m μ gemessen. Die Versuche in Fig. 2 zeigen, dass das pH-Optimum des Enzyms zwischen pH 5,1 und pH 5,3 liegt.

³⁾ ROHM & HAAS CO., Philadelphia, Pa., USA. Wir danken dieser Firma für die Überlassung einer grösseren Menge dieses Enzympräparates. Die Herkunft des Enzympräparates ist uns nicht bekannt.

⁴⁾ P. ALBERSHEIM, H. NEUKOM & H. DEUEL, Arch. Biochemistry Biophysics (im Druck).

⁵⁾ B. VOLLMERT, Makromol. Chem. 5, 110 (1950); H. NEUKOM & H. DEUEL, Chemistry & Ind. 1958, 683.

⁶⁾ A. LINKER, K. MEYER & P. HOFFMAN, J. biol. Chemistry 279, 13 (1956).

⁷⁾ C. E. NEUBECK, J. Assoc. Off. agric. Chemists 42, 374 (1959).

⁸⁾ NUTRITIONAL BIOCHEM. CORP., Cleveland, Ohio, USA.

⁹⁾ Von Herrn E. F. JANSEN, Western Regional Research Laboratory, U.S.D.A., Albany, Calif., USA., zur Verfügung gestellt. Die Herkunft des Enzyms ist uns nicht bekannt.

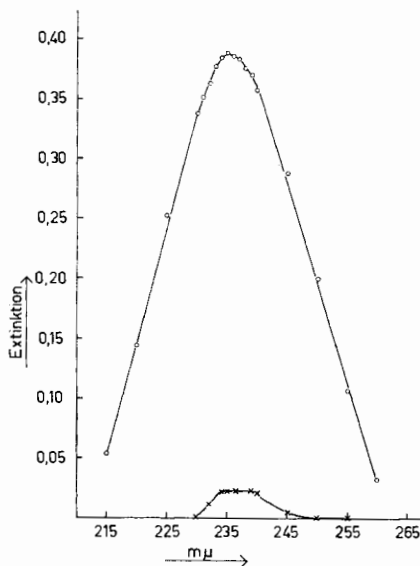


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektren von Pektinlösungen nach Behandlung mit Pektinenzymen
Citrus-Pektin 0,1%, pH 5

—○—○— PECTASIN R-10 —x—x— PECTINASE

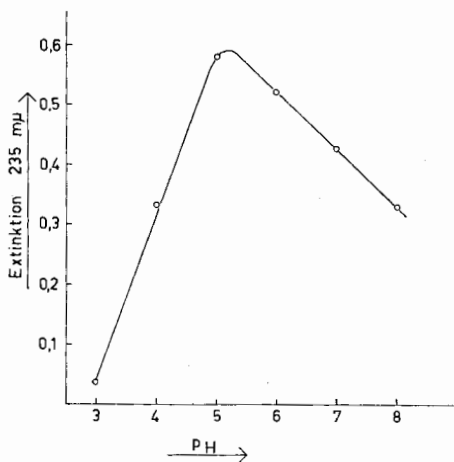


Fig. 2. Bestimmung der Aktivität von Pektin-trans-Eliminase bei verschiedenen pH-Werten

Eine weitere Stütze für die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten konnte durch deren Ozonisierung erbracht werden. LINKER *et al.*⁶⁾ haben gezeigt, dass durch Ozonspaltung ihres C-4-C-5 ungesättigten Uronsäurederivates Oxalsäure gebildet wird. In Pektinlösungen, die mit PECTASIN R-10 behandelt wurden, konnte nach der Ozonisierung ebenfalls Oxalsäure nachgewiesen werden.

Die Reaktion der mit PECTASIN R-10 behandelten Pektinlösungen mit Thiobarbitursäure ergab weitere Anhaltspunkte für die Bildung von ungesättigten Abbaupro-

dukten. Wie Fig. 3 zeigt, ergibt die Reaktion des mit PECTASIN R-10 behandelten Pektins mit Thiobarbitursäure einen roten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei $547\text{ m}\mu$, während Polygalakturonase, die keine Pektin-*trans*-Eliminase-Aktivität besitzt, Abbauprodukte liefert, die ein für Galakturonsäure charakteristisches Maximum bei 510 bis $515\text{ m}\mu$ ergeben¹⁰). Das Maximum bei $547\text{ m}\mu$ entspricht dem mit Formylbrenztraubensäure beobachteten Absorptionsmaximum¹¹), das auch durch Behandlung von Uronsäurelactonen mit Alkali¹⁰) sowie durch Abbau von Pektin in Pufferlösungen bei pH 6 erhalten wird⁴). Die Formylbrenztraubensäure dürfte dabei aus den ungesättigten, enzymatischen Abbauprodukten des Pektins nach einem ähnlichen Mechanismus gebildet werden wie bei der Alkalivorbehandlung der Uronsäurelactone¹⁰).

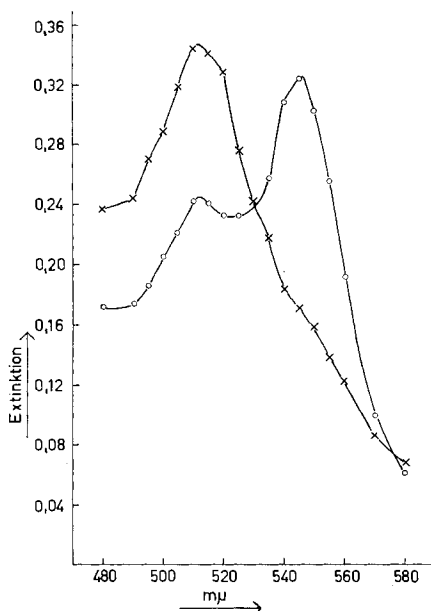


Fig. 3. Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von Pektinabbauproduktion mit Thiobarbitursäure

—o—o— Abbau mit PECTASIN R-10 —x—x— Abbau mit Polygalakturonase

Im Gegensatz zu den meisten bisher bekannten Polygalakturonasen wirkt Pektin-*trans*-Eliminase nur auf Pektin ein, während Pektinsäure nicht angegriffen wird. In dieser Beziehung gleicht diese Eliminase den z. B. von SEEGMILLER & JANSEN¹²) sowie von SCHUBERT¹³) beschriebenen Polymethylgalakturonasen, die ebenfalls nur den Methylester der Pektinsäure, nicht aber Pektinsäure abbauen. Durch Dialyse von PECTASIN R-10, während 1 Woche bei $1-2^{\circ}$, fand keine Aktivitätsverminderung statt, so dass die Pektin-*trans*-Eliminase offenbar keine dialysierbaren Kofaktoren

¹⁰) H. NEUKOM, *Chimia* 14, 165 (1960).

¹¹) A. WEISSBACH & H. HURWITZ, *J. biol. Chemistry* 234, 705 (1959).

¹²) C. G. SEEGMILLER & E. F. JANSEN, *J. biol. Chemistry* 195, 327 (1952).

¹³) E. SCHUBERT, *Melliand Textilber.* 8, 1 (1954).

benötigt. Die papierchromatographische Untersuchung der enzymatischen Abbauprodukte ergab nur ungesättigte oligomere Spaltprodukte, die auf dem Chromatogramm im UV. als dunkle Flecken zu erkennen sind. Das Fehlen von monomeren Spaltprodukten lässt darauf schliessen, dass der Abbau nicht vom Rande her, sondern eher in der Kette erfolgt. Weitere Versuche zur Reinigung und Charakterisierung von Pektin-*trans*-Eliminase sind im Gange.

Experimentelles. – Aus PECTASIN R-10 wurde durch Dialyse und Lyophilisierung ein angereichertes Enzympräparat hergestellt.

Für die Ermittlung des Pektinabbaues mit Hilfe der UV.-Absorption (Fig. 1) wurde eine 2-proz. Lösung von *Citrus*-Pektin (*Citrus pectin N.F.* der SUNKIST GROWERS INC., Corona, Calif., USA., Veresterungsgrad 65%) verwendet, die 0,1M Phosphatpuffer (pH 5) und 0,01% des obigen Enzympräparates enthielt. Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde 1 ml der Mischung auf 20 ml verdünnt und das Absorptionsspektrum zwischen 215 und 260 $m\mu$ gemessen (BECKMAN-Spektrophotometer DU). Ein ähnlicher Versuch wurde mit PECTINASE⁸⁾ und mit einer gereinigten Polygalakturonase⁹⁾ durchgeführt.

Das pH-Optimum (Fig. 2) wurde durch Behandlung einer 0,1-proz. Lösung von *Citrus*-Pektin, die 0,005% des Enzympräparates enthielt, bestimmt. Es wurde die Zunahme der Absorption bei 235 $m\mu$ nach 30 Min. bei Zimmertemperatur bestimmt. Zur Einstellung der verschiedenen pH-Werte enthielten die Lösungen 0,2M McILVAINE-Puffer vom entsprechenden pH.

Zur Ausführung der Thiobarbitursäure-Reaktion (Fig. 3) wurde eine 1,3-proz. Lösung von 100-proz. verestertem Apfelpektin (Apfelpektin verestert mit Diazomethan bei -20°) 48 Std. mit PECTASIN R-10 behandelt (0,07M McILVAINE-Puffer, pH 5). 1 ml der Lösung wurde abpipettiert und mit Thiobarbitursäure-Reagenz erhitzt⁴⁾. Zum Vergleich wurde eine 1-proz. Lösung des *Citrus*-Pektins mit gereinigter Polygalacturonase⁹⁾ während 48 Std. bei pH 5 behandelt und gleich wie oben mit Thiobarbitursäure-Reagenz erhitzt.

Zur Ozonisierung wurde eine 2-proz. Lösung von *Citrus*-Pektin in 0,1M Phosphatpuffer pH 5 mit PECTASIN R-10 während 48 Std. abgebaut. Die Ozonisierung der Lösung und Identifizierung der gebildeten Oxalsäure erfolgte wie früher beschrieben⁴⁾. Die Papierchromatographie der Abbauprodukte wurde mit denselben Laufmitteln ausgeführt wie die papierchromatographische Bestimmung der Oxalsäure.

Der eine von uns (P. A.) dankt der UNITED STATES NATIONAL SCIENCE FOUNDATION für ein Stipendium (*post doctoral research fellowship* No. 49079).

SUMMARY

In a commercial pectinase preparation an enzyme has been found which attacks only the methyl ester of pectic acid. A study of the breakdown products by ultraviolet absorption, ozonation and reaction with thiobarbituric acid indicated the presence of Δ -4,5 unsaturated galacturonic acid groups.

The reaction seems to proceed by a *trans* elimination mechanism, similar to that previously observed for neutral and alkaline degradation of pectin. Therefore the enzyme is designated as pectin *trans* eliminase.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich
