

114. Untersuchungen über Getreideschleimstoffe

II. Über die Gelierung wässriger Lösungen von Weizenmehlpentosanen durch Oxydationsmittel¹⁾

von W. Kündig, H. Neukom und H. Deuel

(29. III. 61)

Oxydative Veränderungen spielen bei der Alterung von Weizenmehl und bei der Verbesserung seiner Backfähigkeit eine wichtige Rolle. Über die Natur der sich dabei abspielenden Reaktionen herrscht noch ziemliche Unklarheit. Meist wird angenommen, dass die Oxydationsmittel an SH-Gruppen der Kleberproteine oder an ungesättigten Fettsäuren der Mehllipide angreifen²⁾. Verschiedene Beobachtungen lassen darauf schliessen, dass vor allem in der wasserlöslichen Mehlfraktion noch andere, bisher unbekannte, oxydierbare Stoffe vorhanden sind³⁾.

BAKER, PARKER & MIZE⁴⁾ beobachteten, dass wässrige Weizenmehlextrakte bei Zugabe von Spuren von Oxydationsmitteln (NaClO_2 , H_2O_2 , KBrO_3 usw.) rasch zu einem Gel erstarren. Die Pentosane sollen für diese Gelbildung verantwortlich sein. Diese oxydative Gelierung ist irreversibel. Das Gel kann durch reduzierende Substanzen nicht mehr verflüssigt werden. Die Gelierung wird in Gegenwart von dispergiertem Kleberprotein stark beschleunigt⁵⁾.

Nach eigenen Versuchen erweist sich die Gelierung zudem als sehr pH-abhängig. Wässrige Mehlextrakte gelieren mit H_2O_2 nur bei pH 5,5 bis 6,5. Werden alkalische oder saure Lösungen wieder auf pH 6 gebracht, so tritt mit H_2O_2 wieder Gelbildung ein.

Die leichte Oxydierbarkeit und das durch Oxydation bedingte Geliervermögen der Mehlpentosane sind für Polysaccharide sehr ungewöhnliche Eigenschaften, die bei Annahme der Mehlpentosane als reine Arabinoxylane⁶⁾ nur schwer verständlich sind.

Die chromatographische Fraktionierung der wasserlöslichen, stärkefreien Weizenmehlpolysaccharide hat gezeigt, dass diese zu ungefähr der Hälfte aus Glykoproteinen bestehen¹⁾. Oxydative Veränderungen könnten daher nicht nur an den Polysacchariden, sondern auch an den Polypeptidanteilen der Glykoproteine auftreten.

Durch Fraktionierung an Diäthylaminoäthyl(DEAE)-Cellulose wird im folgenden versucht, die für die oxydative Gelbildung wässriger Mehlextrakte verantwortliche

¹⁾ I. Mitt.: W. KÜNDIG, H. NEUKOM & H. DEUEL, *Helv.* 44, 823 (1961).

²⁾ Vgl. z. B. S. GOLDSTEIN, *Schweiz. Landwirtschaftl. Monatsh.* 34, 47 (1956); *The Physico-Chemical Properties of Wheat Proteins*, Society of Chemical Industry, Monograph Nr. 6, London 1959; H. A. SOKOL, D. K. MECHAM & J. W. PENCE, *Cereal Chemistry* 37, 151 (1960).

³⁾ Vgl. z. B. D. E. SMITH & J. S. ANDREWS, *Cereal Chemistry* 34, 323 (1957); W. C. SCHAEFER, C. A. WILHAM, R. J. DIMLER & F. R. SENTI, *ibid.* 36, 431 (1959); L. DAHLE & B. SULLIVAN, *ibid.* 37, 679 (1960).

⁴⁾ J. C. BAKER, H. K. PARKER & M. D. MIZE, *Cereal Chemistry* 20, 267 (1943).

⁵⁾ D. C. UDY, *Cereal Chemistry* 34, 37 (1957).

⁶⁾ A. S. PERLIN, *Cereal Chemistry* 28, 370, 382 (1951).

Fraktion zu ermitteln. Eine Lösung von lyophilisiertem, enteweisstem Extrakt aus Manitoba-II-Mehl wurde durch einige Tropfen H_2O_2 -Lösung zur Gelierung gebracht. Nach 2 Std. wurde das Gel mit Wasser versetzt und unter Rühren dispergiert, um die an der Gelstruktur nicht beteiligten Substanzen herauszulösen. Nach mehrmaliger Extraktion und Sedimentation in einer Ultrazentrifuge konnte eine weitgehende Trennung der die Gelstruktur bildenden und der aus dem Gel extrahierbaren Substanzen erzielt werden. Die nicht an der Gelstruktur beteiligten Polysaccharide und Glykoproteine wurden darauf an DEAE-Cellulose fraktioniert (Fig. 2). Durch stufenweise Elution können 5 Fraktionen erhalten werden, analog wie bei der Fraktionierung des nicht oxydierten Extraktes (Fig. 1). Ein Vergleich von Fig. 2 mit Fig. 1 ergibt, dass bei der mit 0,01 M Na-Borat eluierten Glykoproteinfraktion (Fraktion 2) der grösste Substanzverlust durch die Oxydation auftritt. Bei den mit destilliertem Wasser eluierten N-freien Polysacchariden (Fraktion 1) konnte hingegen keine nennenswerte Abnahme festgestellt werden. Das N-freie Arabinoxylan ist also an der Gelierung nicht beteiligt, vielmehr wird ein Teil der Glykoproteine oxydiert und durch

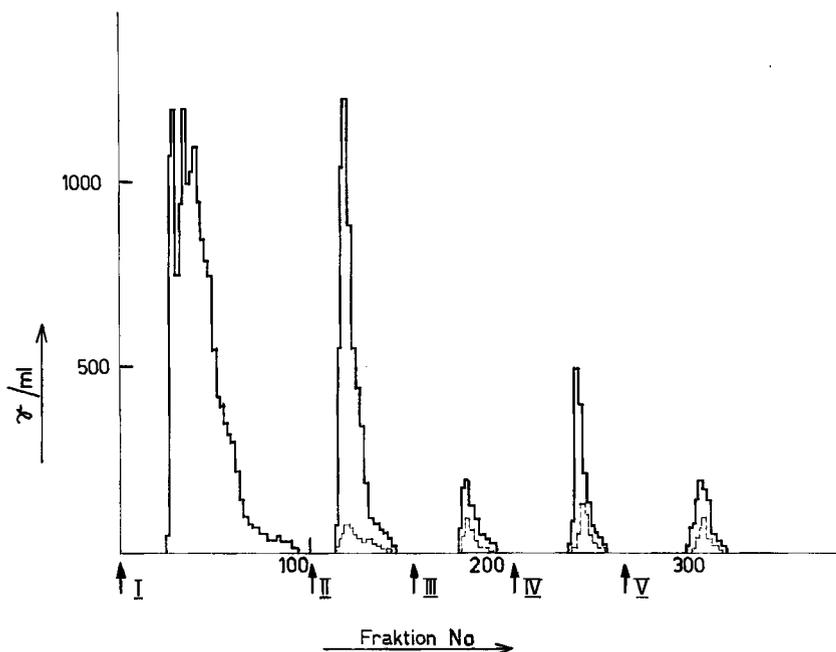


Fig. 1. Fraktionierung der wasserlöslichen Polysaccharide und Glykoproteine (400 mg) aus Manitoba-II-Weizenmehl an DEAE-Cellulose (50 g)

(Lösliche Stärke vor der Fraktionierung nicht abgebaut)

Boratform; Elutionslösungen: I H_2O ; II 0,01 M, III 0,1 M, IV 0,5 M Na-Borat; V 0,5 N NaOH

Fraktionsvolumen 12 ml

—— Polysaccharide

----- Proteine

die dabei auftretende Vernetzung der Makromolekeln unlöslich. Bei diesen Versuchen wurde die in den verwendeten Mehlextrakten vorhandene lösliche Stärke nicht mit α -Amylase abgebaut¹⁾; diese lösliche Stärke erscheint daher zusammen mit dem

N-freien Arabinoxylan in der Fraktion I. Die prozentualen Anteile und die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen der an der Gelstruktur nicht beteiligten Substanzen sind in der Tabelle zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass die Gelstruktur ca. 30% des gesamten lyophilisierten Mehlextraktes und ca. 60% des Proteinanteils der Glykoproteine enthält. In der Gelstruktur konnten nach Hydrolyse mit 0,5N HNO_3 Arabinose und Xylose, aber nur Spuren von Galaktose nachgewiesen werden. Nach Hydrolyse der Gelfraktion mit 57-proz. HJ wurden sämtliche in den Glykoproteinen vorkommenden Aminosäuren¹⁾ gefunden.

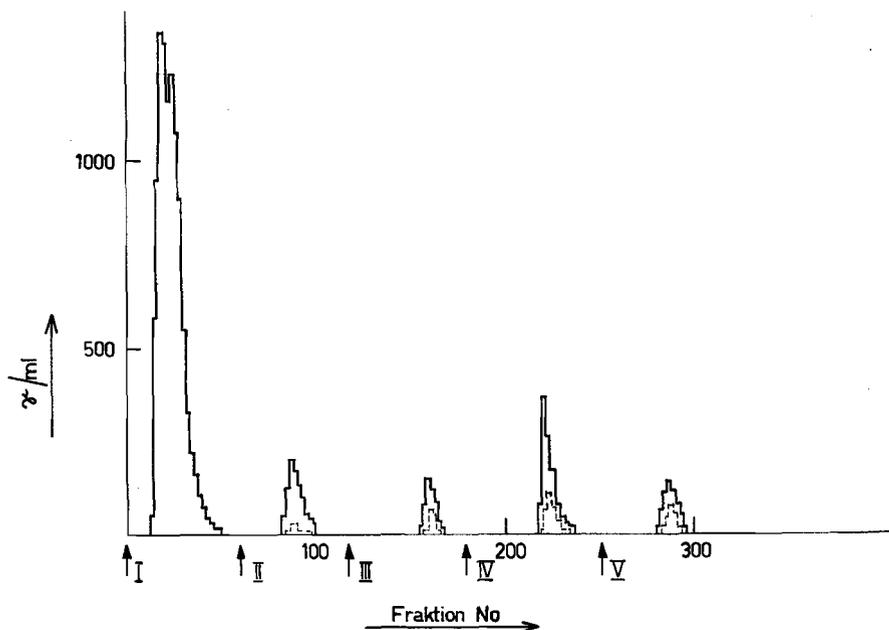


Fig. 2. *Fraktionierung der nach Oxydation wasserlöslich bleibenden Polysaccharide und Glykoproteine aus Manitoba-II-Weizenmehl an DEAE-Cellulose (50 g)*

(Wässriger Extrakt aus 40 ml Gel, das durch Zugabe von 10 Tropfen 1-proz. H_2O_2 -Lösung zu 40 ml 1-proz. Weizenmehlextrakt hergestellt wurde.)

Elutionslösungen und Fraktionsvolumen wie in Fig. 1

Die UV.-Absorptionsspektren der wässrigen Mehlextrakte zeigen nach Zugabe von Oxydationsmittel ebenfalls Veränderungen. Nach KWART & SHASHOUA⁷⁾ rührt die UV.-Absorption von Polysaccharid-Protein-Komplexen zum grössten Teil von der Proteinkomponente her, da neutrale Polysaccharide im Gebiet von 240 bis 350 $\text{m}\mu$ meist nur eine geringe Absorption zeigen. Unbehandelter Mehlextrakt weist bei neutraler Reaktion neben dem Tyrosinmaximum bei 275 $\text{m}\mu$ ein weiteres Maximum bei 320 $\text{m}\mu$ auf (Fig. 3). Beim mit H_2O_2 gelierten Mehlextrakt verschwindet das zweite Maximum bei 320 $\text{m}\mu$.

⁷⁾ H. KWART & V. E. SHASHOUA, J. Amer. chem. Soc. 80, 2230 (1958).

Fraktionierung der nach Oxydation wasserlöslich bleibenden Polysaccharide und Glykoproteine aus Manitoba-II-Weizenmehl an DEAE-Cellulose (50 g) (vgl. Fig. 2)

Fraktion Nr. (eluiert mit)	Ausbeute a) %	Verlust b) %	Zusammensetzung der Fraktionen		
			Protein- gehalt (N × 6,25) %	Poly- saccharid- gehalt %	Qualitative Zusammensetzung der Polysaccharide
1 (Wasser)	48,6	5,8	—	100	Glucose, Arabinose, Xylose
2 (0,01 M Na-Borat)	3,7	85,5	10	90	Glucose ^{c)} , Galaktose, Arabinose
3 (0,1 M Na-Borat)	6,0	28,0	23	77	Galaktose, Arabinose
4 (0,5 M Na-Borat)	8,4	18,0	34	66	Galaktose, Arabinose, Xylose ^{c)}
5 (0,5 N NaOH)	3,4	19,0	38	62	Galaktose ^{c)} , Arabinose, Xylose

a) bezogen auf unbehandelten lyophilisierten Mehlextrakt.
b) durch oxydative Gelierung eingetretener Verlust gegenüber der entsprechenden Fraktion des unbehandelten Mehlextraktes.
c) nur in Spuren nachweisbar.

In alkalischem Milieu tritt die bekannte Rotverschiebung des Tyrosinmaximums⁸⁾ auf, aber auch das zweite Maximum bei 320 m μ erfährt eine Rotverschiebung um 8 bis 10 m μ und gleichzeitig eine Verstärkung (vgl. Fig. 4).

Es ist bekannt, dass verschiedene o-Dihydroxyverbindungen UV.-Absorptionsbanden bei 300 bis 330 m μ haben. YASONOBU, PETTERSON & MASON⁹⁾ erhielten bei ihren Versuchen über die Veränderung von Tyrosylpeptiden durch Tyrosinase ähnliche Spektren, wie sie mit unseren unbehandelten Mehlextrakten erhalten wurden. Das bei 325 m μ beobachtete Maximum soll dabei von 2-Carboxy-5,6-dihydroxy-indol herrühren, der wahrscheinlichen Endstufe der enzymatischen und chemischen Veränderung von Tyrosylresten. Um die Frage des Vorhandenseins einer o-Dihydroxy-Gruppierung in Mehlextrakten abzuklären, wurden die UV.-Spektren mit verschiedenen Zusätzen, wie Na-Borat, 1N NaOH gesättigt mit GeO₂, und Na-Molybdat, aufgenommen. Borat, Molybdat und Germanat bilden mit o-Dihydroxygruppen Chelatkomplexe¹⁰⁾, die eine deutliche Verstärkung der Dihydroxy-Maxima bewirken. Borat und Germanat bewirken starke Rotverschiebungen des zweiten Maximums von 320 m μ nach 371 m μ bzw. 356 m μ (Fig. 4).

⁸⁾ Z. B.: C. TANFORD & G. C. ROBERTS, J. Amer. chem. Soc. 74, 2508 (1952); C. TANFORD, J. D. HAUSENSTEIN & D. G. RANDS, *ibid.* 77, 6409 (1955); C. C. BIGELOW & I. I. GESCHWIND, C. r. Lab. Carlsberg 37, 283 (1959).

⁹⁾ K. T. YASONOBU, E. W. PETTERSON & H. MASON, J. biol. Chemistry 273, 3291 (1959).

¹⁰⁾ Z. B.: P. BÉVILLARD, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. 234, 2606 (1952); 235, 880 (1952); A. PFLUGMACHER & I. ROHRMANN, Angew. Chem. 69, 778 (1957); J. B. PRIDHAM, J. Chromatogr. 2, 605 (1959); P. I. ANTIKAINEN, Acta chem. scand. 13, 312 (1959); E. J. BOURNE, D. H. HUTSON & H. WEIGEL, J. chem. Soc. 1960, 4252.

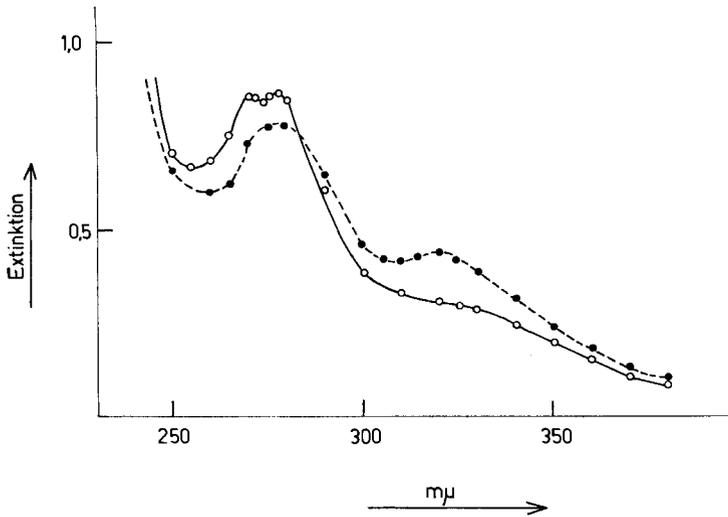


Fig. 3. UV.-Absorptionsspektren von 0,5-proz. Lösungen von lyophilisiertem Mehlextrakt in Wasser

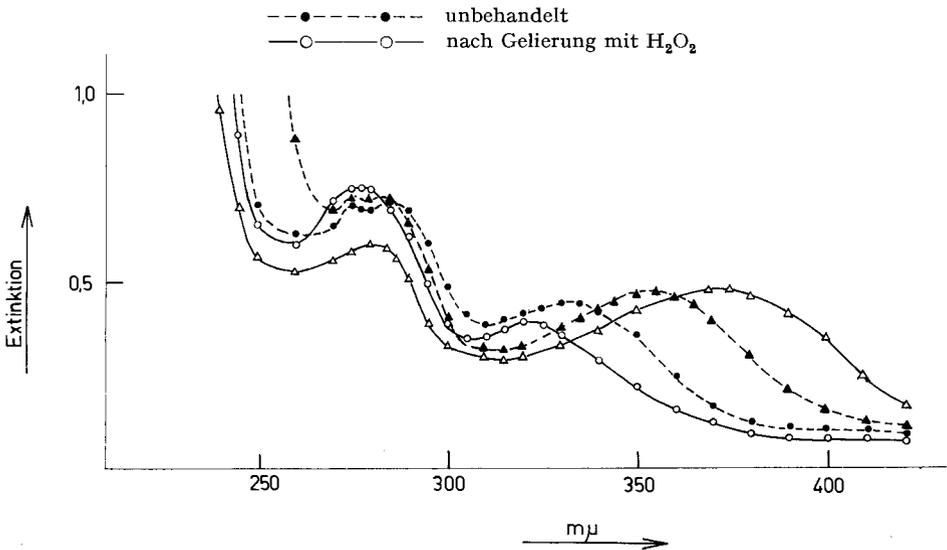


Fig. 4. UV.-Absorptionsspektren von 0,5-proz. Lösungen von lyophilisiertem unbehandeltem Mehlextrakt in Gegenwart verschiedener Elektrolyte

- Wasser
- 1 N NaOH
- △—△— 0,2 M Na-Borat
- ▲—▲— 1 N NaOH gesättigt mit GeO₂

Das UV.-Spektrum des Mehlextraktes in einer 1-proz. wässrigen Lösung von Na-Molybdat zeigte keine Veränderungen gegenüber dem Spektrum in Wasser. Spektren nach Zusatz von FeCl₃, das ebenfalls Komplexe mit o-Dihydroxy-Gruppierungen bildet, konnten nicht aufgenommen werden, da die Zugabe von einigen Tropfen FeCl₃-Lösung zu Mehlextrakt eine sofortige Gelierung bewirkte. Im UV.-Spek-

trum des mit H_2O_2 oxydierten Mehlextraktes konnte weder mit Borat noch mit Germanat eine Komplexbildung beobachtet werden, d. h. durch die Oxydation und Gelbildung verschwindet die komplexbildende Gruppierung.

Nach Methylierung des Mehlextraktes mit Diazomethan in Äther konnte im UV.-Spektrum keine Komplexbildung mehr mit Borat oder Germanat beobachtet werden. Der methylierte Extrakt konnte durch H_2O_2 auch nicht mehr zur Gelierung gebracht werden. Nach Reduktion des Mehlextraktes mit NaBH_4 wurden im UV.-Spektrum keine Veränderungen gegenüber unbehandeltem Extrakt beobachtet. Die für die Komplexbildung mit Borat verantwortliche Gruppierung ist demnach durch NaBH_4 nicht reduzierbar; auch die Gelierung mit H_2O_2 wurde durch die Behandlung mit NaBH_4 nicht beeinträchtigt. Bei der komplexbildenden Gruppe des Mehlextraktes dürfte es sich demnach mit grosser Wahrscheinlichkeit um eine leicht oxydierbare o-Dihydroxy-Gruppierung oder um ein aliphatisches En-diol handeln.

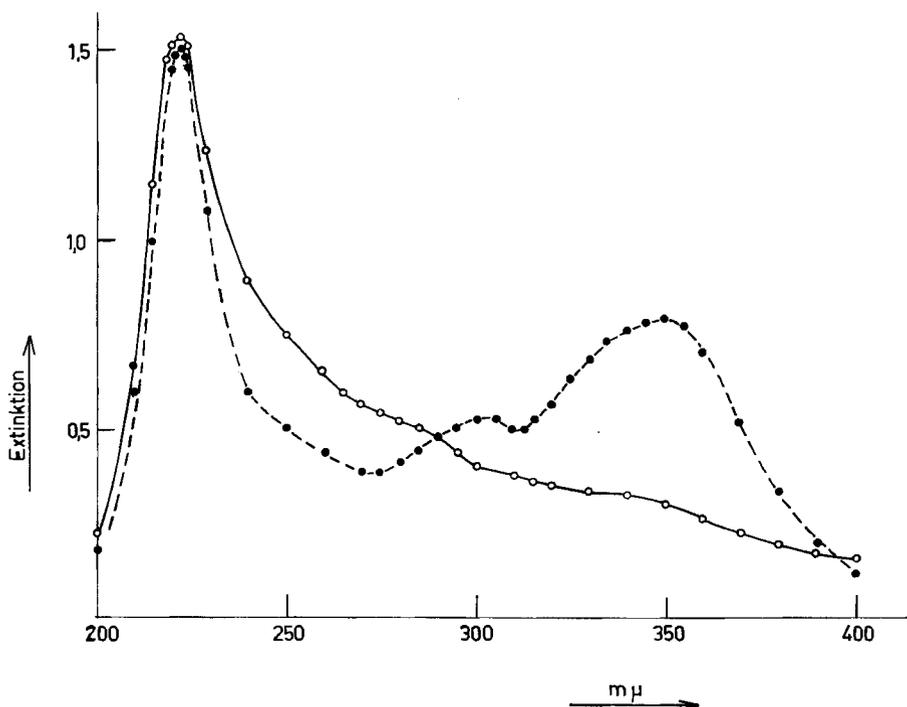


Fig. 5. UV.-Absorptionsspektren der Xylan-Protein-Komplexe in 1N NaOH bei Zusatz von Borsäure

- Xylan-Protein-Komplex aus unbehandeltem Mehlextrakt
- Xylan-Protein-Komplex aus mit H_2O_2 geliertem Mehlextrakt

Um einen Anhaltspunkt über die Lokalisation der möglichen Dihydroxygruppierung zu erhalten, wurden die UV.-Spektren der einzelnen Fraktionen der chromatographischen Trennung von Mehlextrakt (Fig. 1) in 0,2M Na-Borat aufgenommen. Vor allem das Glykoprotein der Fraktion 2 zeigte das charakteristische Maximum bei 371 $\text{m}\mu$ deutlich.

Wenn man den Mehlextrakt mit 1N HCl bei Zimmertemperatur hydrolysiert, so bildet sich ein unlöslicher Niederschlag von Xylan bzw. Xylan-Protein-Komplex, der aus Fraktion 1 bzw. 2 stammt¹⁾. Wird der Niederschlag in 1N NaOH gelöst und nach Zusatz von Borsäure das UV.-Spektrum gemessen, so zeigt sich ebenfalls das beschriebene Maximum bei 371 m μ . Wenn der Mehlextrakt hingegen vor der milden Säurehydrolyse mit H₂O₂ oxydiert wird, verschwindet dieses Maximum (Fig. 5). Das scharfe Maximum bei 224 m μ in Fig. 5 stammt, wie verschiedene Messungen ergaben, vom Xylan selbst und konnte auch in Xylanen aus Weizenstroh gefunden werden.

Verschiedene Versuche über den Abbau der Glykoproteine zu niedermolekularen Verbindungen, die eine Dihydroxygruppierung enthalten, scheiterten bisher. Da die für die Gelierung verantwortliche Gruppe empfindlich gegenüber Oxydationsmitteln ist und zudem nur in sehr geringer Menge als Bestandteil der hochmolekularen Glykoproteine vorhanden ist, bereitet die Isolierung charakteristischer Abbauprodukte erhebliche Schwierigkeiten.

Es darf aus den oben beschriebenen Versuchen abgeleitet werden, dass an der oxydativen Gelierung wässriger Mehlextrakte mit grosser Wahrscheinlichkeit oxydationslabile Dihydroxygruppierungen beteiligt sind. Es ist anzunehmen, dass aus der Dihydroxygruppierung zuerst eine Diketoverbindung (z. B. ein o-Chinon) entsteht, die dann mit einer anderen reaktionsfähigen Gruppe der Glykoproteine unter Vernetzung der Makromolekeln reagiert. Eine Kupplungsreaktion zwischen Oxydationsprodukten von Dihydroxygruppierungen und Thiolgruppen, wie sie z. B. von ROSTON¹¹⁾ und von BOUCHILLOUX & KODJA¹²⁾ beschrieben wurde, kommt im Falle der Mehlextrakte nicht in Frage. Mehlextrakte gelieren auch in Gegenwart grösserer Konzentrationen von SH-Gruppen blockierenden Reagenzien, wie N-Äthylmaleinimid oder *p*-Chlormercuribenzoessäure. Eine Reaktion von o-Chinongruppen mit ϵ -Aminogruppen von Lysinresten, wie sie bei der oxydativen Veränderung von Seidenfibroin angenommen wurde¹³⁾, ist im Falle der Mehlextrakte ebenfalls fraglich. Bei der quantitativen Bestimmung der freien ϵ -Aminogruppen der in den Glykoproteinen enthaltenen Lysinreste mit Fluordinitrobenzol¹⁴⁾ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen geliertem und unbehandeltem Mehlextrakt festgestellt werden. Bei der Vernetzung der Glykoproteine der Mehlextrakte muss demnach die oxydierte Gruppierung mit einer andern, noch unbekanntem reaktionsfähigen Gruppe reagieren.

Experimentelles. – Die Herstellung und Fraktionierung der wässrigen Mehlextrakte erfolgte wie früher beschrieben¹⁾.

Die UV.-Absorptionsspektren wurden mit einem BECKMAN-DU-Spektrophotometer in 1-cm-Quarzküvetten aufgenommen. Es wurden jeweils 0,5-proz. Lösungen von lyophilisiertem Mehlextrakt verwendet.

Gelierung der Mehlextrakte. Zur Gelbildung waren mindestens 0,5-proz. Lösungen von lyophilisiertem Mehlextrakt notwendig. Zur Gelierung wurden meist 3 Tropfen 1-proz. H₂O₂ pro 10 ml Lösung zugegeben.

Extraktion der an der Gelstruktur nicht beteiligten Substanzen des Mehlextraktes. 800 mg lyophilisierter Mehlextrakt wurden in 40 ml Wasser gelöst und durch Zugabe von einigen Tropfen

¹¹⁾ J. ROSTON, J. biol. Chemistry 235, 1002 (1960).

¹²⁾ S. BOUCHILLOUX & A. KODJA, Bull. Soc. Chim. biol. 42, 1045 (1960).

¹³⁾ C. EARLAND & J. P. G. STELL, Biochim. biophys. Acta 23, 97 (1957).

¹⁴⁾ F. SANGER, Biochem. J. 39, 507 (1945).

1-proz. H_2O_2 zur Gelierung gebracht. Nach 2 Std. wurde das Gel unter Rühren im 5-fachen Volumen Wasser dispergiert. Die Geldispersion wurde 12 Std. gerührt, worauf die Gelpartikeln in einer SPINCO-Ultrazentrifuge bei ca. $100000 \times g$ sedimentiert wurden. Die überstehende Lösung wurde dekantiert und das Sediment wieder, wie oben beschrieben, extrahiert. Nach 4maliger Extraktion konnten in der überstehenden Lösung keine Polysaccharide oder Proteine mehr nachgewiesen werden. Die vereinigten Extrakte wurden im Rotationsverdampfer unter Vakuum konzentriert und darauf an DEAE-Cellulose fraktioniert. Das Sediment wurde nach der Extraktion mehrmals mit Alkohol gewaschen und nachher im Hochvakuum getrocknet.

Methylierung des Mehlextraktes. 400 mg lyophilisierter Mehlextrakt wurden unter Rühren in 100 ml peroxidfreiem Äther in einem ERLLENMEYER-Kolben mit Schliffstopfen suspendiert. Die Suspension wurde auf ca. -10° gekühlt, mit einer ätherischen Lösung von frisch hergestelltem Diazomethan versetzt und 1 Std. bei -5° , bis 0° stengelassen. Der methylierte Extrakt wurde mehrmals auf einer Glasfilternutsche mit Äther gewaschen und darauf im Hochvakuum getrocknet. Gef. OCH_3 1,8%; 0,1% beim nicht-methylierten Extrakt.

Reduktion des Mehlextraktes mit $NaBH_4$. 20 ml einer wässrigen 1-proz. Lösung von lyophilisiertem Mehlextrakt wurden mit 100 mg $NaBH_4$ versetzt und 2 Std. gerührt. Dann wurde zur Zerstörung des überschüssigen $NaBH_4$ mit 1 N HCl auf pH 5 eingestellt. Die Lösung wurde darauf 48 Std. gegen destilliertes Wasser dialysiert.

*Quantitative Bestimmung der freien ϵ -Aminogruppen im gelierten und unbehandelten Mehlextrakt*¹⁴⁾. 100 ml einer 1-proz. Lösung von lyophilisiertem Mehlextrakt wurden mit 100 ml 4-proz. $NaHCO_3$ versetzt. Nach der Zugabe von 5 ml Fluordinitrobenzol, gelöst in 30 ml Alkohol, wurde die Reaktionslösung 2 Std. im Dunkeln geschüttelt. Nachher wurde mit dem 4fachen Volumen Alkohol versetzt und über Nacht im Kühlschrank stengelassen. Die ausgeflockten Polysaccharide und Glykoproteine wurden abzentrifugiert. Durch 18-stdg. Hydrolyse mit 2 N HCl bei 85° konnte der grösste Teil der Polysaccharide abgebaut werden, wobei die Dinitrophenol (DNP)-Derivate der Proteine als unlösliches Sediment zurückblieben. Dieses wurde von der überstehenden Lösung abgetrennt und in einem zugeschnittenen Glasrohr mit 6 N HCl 10 Std. bei 135° hydrolysiert. Mit Äther konnte ein grosser Teil der DNP-Aminosäuren extrahiert werden, so dass im n-Butanol-Extrakt hauptsächlich nur noch das ϵ -DNP-Lysin vorhanden war. Dieses wurde darauf von den anderen mit n-Butanol extrahierten, nicht mit Fluordinitrobenzol umgesetzten Aminosäuren durch Papierchromatographie getrennt (WHATMAN-Papier Nr. 1, absteigend, n-Butanol:Eisessig:Wasser = 12:3:5). Das ϵ -DNP-Lysin wurde mit 2-proz. $NaHCO_3$ aus dem Papier eluiert und seine Konzentration im Eluat photometrisch bei $362 m\mu$ ermittelt. Das für die Eichkurve notwendige ϵ -DNP-Lysin wurde nach PORTER & SANGER¹⁵⁾ dargestellt.

Die vorliegende Arbeit wurde durch finanzielle Unterstützung der Firma GEBRÜDER BÜHLER, Uzwil, ermöglicht. Wir danken bestens für diese Unterstützung.

SUMMARY

Aqueous extracts of wheat flour are known to gel readily in the presence of small amounts of oxidizing agents. It is shown by chromatographic fractionation on DEAE-cellulose that the glycoproteins present in aqueous flour extracts are responsible for the gelation. The UV.-spectra of the glycoproteins show an absorption maximum at $320 m\mu$ in addition to the protein maximum at $275 m\mu$. The maximum at $320 m\mu$ is enhanced and shifted to longer wave-lengths by the addition of borate or germanate. This indicates the presence of an o-dihydroxy or an aliphatic ene-diol structure in the glycoproteins. Furthermore the maximum at $320 m\mu$ disappears upon oxidation. It is likely that the gelation is caused by an oxidation of the dihydroxy grouping, followed by the formation of cross-links between the glycoprotein molecules.

Agrikulturchemisches Institut
der Eid. Technischen Hochschule, Zürich

¹⁵⁾ R. R. PORTER & F. SANGER, Biochem. J. 42, 287 (1948).