

239. Chromatographische Fraktionierung von Pektinstoffen an Diäthylaminoäthyl-Cellulose¹⁾

15. Mitteilung über Ionenaustauscher²⁾

von **W. Heri, H. Neukom** und **H. Deuel**

(25. IX. 61)

Cellulose-Anionenaustauscher, die sich zur Fraktionierung von Proteinen und Nucleinsäuren bewährt haben, eignen sich auch zur Auftrennung von Polysaccharidgemischen³⁻⁶⁾. An Diäthylaminoäthyl-(DEAE)-Cellulose lassen sich auch Pektinpräparate fraktionieren⁴⁾. Dabei konnte gezeigt werden, dass der grösste Teil der in Pektinstoffen stets vorhandenen neutralen Begleitzkohlenhydrate sich von der Polygalakturonsäure (PGS) nicht trennen lassen und wahrscheinlich kovalent als Seitenketten gebunden sind. Diese Seitenketten bestehen vor allem aus Arabinose- und Galaktose-Bausteinen.

In dieser Arbeit werden weitere chromatographische Trennungen von Pektinstoffen nach dem Gehalt an *Seitenketten*, nach dem *Veresterungsgrad* mit Methanol und nach dem *Polymerisationsgrad* der PGS-Hauptketten beschrieben. Über den Einfluss der Verteilung der Methylester-Gruppen längs dieser Hauptketten auf das Haftvermögen an DEAE-Cellulose wird in der folgenden Arbeit berichtet⁷⁾.

Je nach Pflanzenart, Gewebeart, Wachstumsbedingungen, Wachstumsstadium, Extraktions- und Reinigungsmethode variiert die Zusammensetzung von Pektinpräparaten sehr stark. Pektinpräparate haben sich u. a. beim Ultrazentrifugieren, bei der Elektrophorese und bei der fraktionierten Fällung stets als heterogen erwiesen⁸⁾. Es ist kaum anzunehmen, dass in einem Pektinpräparat auch nur zwei Makromolekeln miteinander identisch sind⁹⁾. Von Makromolekel zu Makromolekel können variieren: die Art und Menge der Seitenketten, der Veresterungsgrad der PGS-Hauptkette mit Methanol, die Verteilung der Methylester-Gruppen längs der Hauptkette, der Acetylierungsgrad und der Polymerisationsgrad der Hauptkette. Es sei betont, dass die Existenz kovalent gebundener Seitenketten noch nicht durch direkte chemische Methoden bewiesen, aber wegen verschiedener Beobachtungen angenommen wurde^{4) 8) 10)}.

¹⁾ Auszug aus Diss. W. HERI, ETH, Zürich, im Druck.

²⁾ 14. Mitteilung: M. MÜLLER, N. C. MEHTA & H. DEUEL, Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde **90**, 139 (1960).

³⁾ N. R. RINGERTZ & P. REICHARD, Acta chem. scand. **13**, 1467 (1959); **14**, 303 (1960).

⁴⁾ H. NEUKOM, H. DEUEL, W. J. HERI & W. KÜNDIG, Helv. **43**, 64 (1960).

⁵⁾ W. KÜNDIG, H. NEUKOM & H. DEUEL, Helv. **44**, 823, 969 (1961).

⁶⁾ T. LAURENT, Arch. Biochemistry Biophysics **92**, 224 (1961).

⁷⁾ W. HERI, H. NEUKOM & H. DEUEL, Helv. **44**, 1945 (1961).

⁸⁾ Z. I. KERTESZ, The Pectic Substances, Interscience Publ. Inc., New York 1951; H. DEUEL & E. STUTZ, Advances Enzymol. **20**, 341 (1958); R. M. MCCREARY & M. GEE, J. Agr. Food Chemistry **8**, 510 (1960).

⁹⁾ R. SPEISER, C. R. EDDY & C. H. HILL, J. phys. Chemistry **49**, 563 (1945).

¹⁰⁾ Z. B. H. LÜDTKE & H. FELSER, Liebigs Ann. Chem. **549**, 1 (1941); E. L. HIRST & J. K. N. JONES, Advances Carbohydrate Chemistry **3**, 235 (1946); G. O. ASPINALL & A. CAÑAS-RODRIGUEZ, J. chem. Soc. **1958**, 4020 (1958); P. ANDREWS, L. HOUGH, D. B. POWELL & B. M. WOODS, *ibid.* **1959**, 774.

Zunächst wurde der Einfluss der *Seitenketten* auf das chromatographische Verhalten von Pektinstoffen studiert. Meist ist der PGS-Gehalt ein brauchbares Mass zur Abschätzung der Menge an Begleit-Kohlenhydraten in Pektinpräparaten. Als Ausgangsmaterial diente ein schonend mit NaOH aus Zuckerrübenmark isoliertes Na-Pektat (Präparat 1). Dieses Pektat war relativ reich an Arabinose und Galaktose (nach Säurehydrolyse), relativ arm an PGS und praktisch frei von störenden Methyl-ester- und Acetyl-Gruppen. Durch milde saure Hydrolyse, durch welche die PGS-Hauptkette nicht gespalten wird, wurden aus dem Präparat 1 zwei Pektate (Präparate 2 und 3) mit geringerem Gehalt an Arabinose und Galaktose gewonnen (Tab. 1). Es ist bemerkenswert, dass die Viskositätszahl, die pro Milliäq. PGS berechnet ist, mit steigendem PGS-Gehalt des Pektates zunimmt. Ein solcher Anstieg ist schon früher beobachtet worden¹¹⁾. Die Ergebnisse der Fraktionierungen der drei Pektate an DEAE-Cellulose sind in Tab. 1 und in der Figur zusammengestellt.

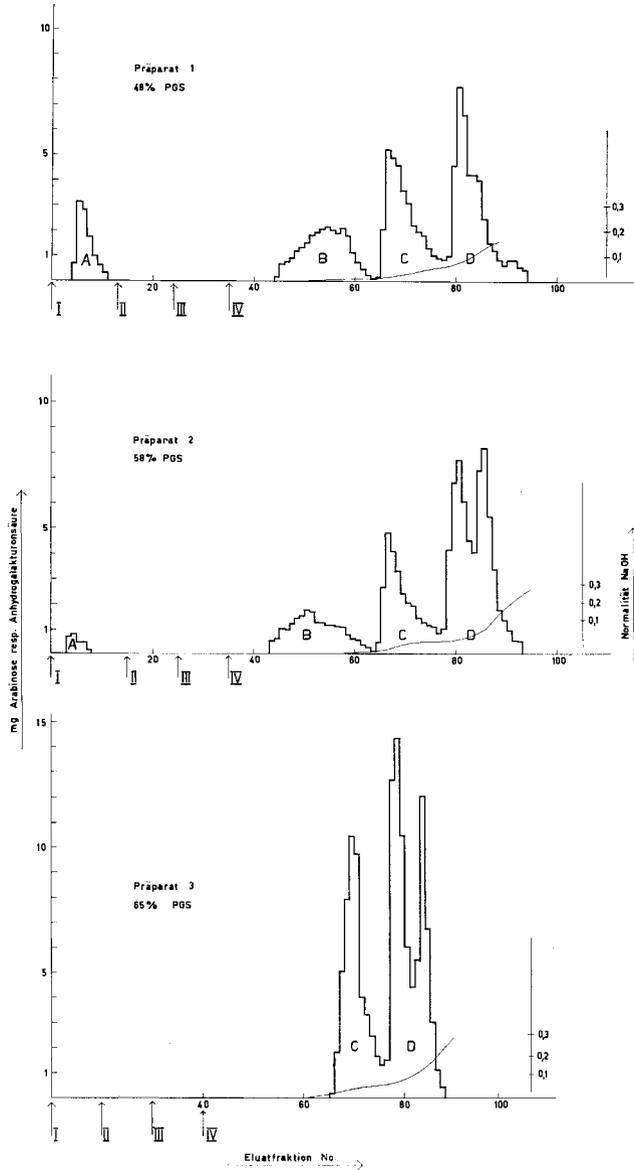
Tabelle 1. *Fraktionierung von Zuckerrüben-Na-Pektaten verschiedenen Gehaltes an Seitenketten an DEAE-Cellulose (vgl. Figur)*

Präparat	Hydrolyse- dauer Std.	PGS- Gehalt %	Viskositäts- zahl Z	Verteilung der PGS auf die Fraktionen, %		
				B	C	D
1	0	48	0,73	24	35	41
2	8	58	0,77	18	25	57
3	42	65	0,90	0	38	62

Das Ausgangspektat 1 lässt sich in vier Fraktionen auftrennen. Fraktion A, die bereits mit verdünntem Phosphatpuffer eluiert wurde, ist ein uronsäurefreies Araban. Die Pektatfraktionen B, C und D werden erst bei der Gradientelution mit NaOH erhalten. Nach dem Ergebnis der vollständigen Säurehydrolyse enthalten sie alle noch Arabinose und Galaktose. Es handelt sich dabei um die Hauptmenge an Arabinose und Galaktose, die sicher kovalent an die Pektat-Makromolekeln gebunden ist. Der Gehalt an PGS beträgt für B 33%, für C 51% und für D 90% bei einem mittleren PGS-Gehalt des Präparates 1 von 48%. Das Pektat 1 lässt sich also in Fraktionen verschiedenen PGS-Gehaltes auftrennen. Auch die Pektate 2 und 3 mit einem verminderten Gehalt an Seitenketten sind noch heterogen. Mit fallendem Gehalt an Seitenketten nimmt also die Haftfestigkeit am Anionenaustauscher deutlich zu. Die durch Säurebehandlung abgespaltenen Arabinose- und Galaktose-haltigen Bruchstücke sind offenbar niedermolekular und alkohollöslich, da sonst Fraktion A (Araban) entsprechend zugenommen hätte.

Es wurde nun geprüft, ob eine chromatographische Fraktionierung auch nach dem *Veresterungsgrad* des Pektins mit Methanol erfolgen kann. Es wird allgemein angenommen, dass es sich bei diesem Veresterungsgrad um einen Mittelwert handelt. Ein Pektinpräparat sollte sich daher in Fraktionen verschiedenen Veresterungsgrades zerlegen lassen. Zudem sollten sich Pektinpräparate verschiedenen mittleren Veresterungsgrades, aber sonst möglichst gleichen Aufbaus bei der Chromatographie

¹¹⁾ G. SCHNEIDER & H. BOCK, Ber. deutsch. chem. Ges. 70, 1617 (1937).



Fraktionierung von Zuckerrüben-Na-Pektaten verschiedenen Gehaltes an Seitenketten an DEAE-Cellulose (vgl. Tab. 1)

Je 200 mg Na-Pektat und 20 g DEAE-Cellulose in der Phosphatform, pH 5,5; Elutionslösungen: I 0,025M, II 0,05M, III 0,1M Na-Phosphatpuffer pH 5,5, IV Gradientelution mit 0,01 bis 0,3N NaOH; Volumen der Eluatfraktionen je 20 ml.

unterschiedlich verhalten. Es wurden Pektinpräparate untersucht, die unter sauren Bedingungen aus Pflanzenmaterial extrahiert und deshalb relativ arm an Seitenketten waren. In Tabelle 2 sind die Pektinpräparate, die alle einen PGS-Gehalt von

etwa 80% besitzen, kurz charakterisiert und die Ergebnisse der Fraktionierung zusammengestellt. Die Elutionskurven lassen alle scharf getrennte Pektinfraktionen erkennen; sie werden hier nicht wiedergegeben.

Tabelle 2. *Fraktionierung von Pektinen verschiedenen Veresterungsgrades an DEAE-Cellulose*
Je 300 mg Pektin und 20 g DEAE-Cellulose in der Phosphatform, pH 4,5; Elutionslösungen:
I 0,2M, II 0,3M, III 0,45M, IV 0,6M, V 1M NaH_2PO_4

Präparat	Gewinnung	Veresterungs- grad %	Verteilung der PGS auf die Fraktionen, %				
			I	II	III	IV	V
4	Apfelpektin verestert mit $\text{HCl}-\text{CH}_3\text{OH}$	97	80	20	0	0	0
5	Citruspektin des Handels	63	22	36	32	10	0
6	Apfelpektin des Handels	63	22	62	15	1	0
7	Präparat 6 schwach sauer verseift	48	1	5	79	15	0
8	Präparat 6 stark sauer verseift	29	2	5	62	29	2

Die fünf Pektinpräparate liessen sich in Fraktionen auftrennen, die sich wohl vor allem im Veresterungsgrad unterscheiden. Die nacheinander eluierten Fraktionen des Präparates 6 (mittlerer Veresterungsgrad 63%) hatten folgende Veresterungsgrade: I 78% II 62%, und III 39%. Erwartungsgemäss liessen sich die Fraktionen mit abnehmendem Veresterungsgrad schwerer eluieren. – Mit abnehmendem mittlerem Veresterungsgrad der fünf Präparate nimmt die Haftfestigkeit am Anionenaustauscher zu. Unverestertes Pektat lässt sich mit den verwendeten Elutionsmitteln praktisch nicht ablösen. – Bemerkenswert ist das verschiedene chromatographische Verhalten des Citrus- und des Apfelpektins, die beide den gleichen mittleren Veresterungsgrad von 63% besitzen. Das Citruspektin ist heterogener, wohl in Bezug auf den Veresterungsgrad und vielleicht auch auf die Verteilung der Methylester-Gruppen längs der Fadenmolekeln. Dies mag durch partielle enzymatische Verseifung des Citruspektins bedingt sein. Vielleicht stehen die unterschiedlichen Gelieereigenschaften von Apfel- und von Citruspektin mit den hier beobachteten Heterogenitätsunterschieden in Zusammenhang.

Es wurde nun noch untersucht, ob eine chromatographische Auftrennung nach dem *Polymerisationsgrad* der PGS-Hauptketten möglich ist. Oligogalakturonsäuren lassen sich an Kunstharz-Anionenaustauschern gut trennen; ihre Haftfestigkeit nimmt mit dem Polymerisationsgrad sehr stark zu¹²⁾. Für die folgenden Versuche wurden Apfel-Na-Pektate verwendet, die frei von Methoxyl- und Acetyl-Gruppen und sehr arm an Seitengruppen sind. Eine Fraktionierung dürfte bei diesen Präparaten vor allem durch Verschiedenheit der Kettenlänge bedingt sein. Das hochveresterte Pektinpräparat 4 (Tab. 2) wurde mit dem doppelten Überschuss an NaOH bei verschiedenen Temperaturen völlig zu Na-Pektat verseift. Je höher die Ver-

¹²⁾ R. DERUNGS & H. DEUEL, *Helv.* 37, 657 (1954); R. DERUNGS, Diss. ETH, Zürich 1958.

seifungstemperatur ist, desto stärker abgebaute Pektate fallen an¹³⁾. In Tabelle 3 sind die Pektat-Präparate 9 bis 11 kurz charakterisiert und die Ergebnisse der Trennung zusammengestellt.

Tabelle 3. *Fraktionierung von Na-Pektaten verschiedenen Polymerisationsgrades an DEAE-Cellulose*
Je 200 mg Na-Pektat und 20 g DEAE-Cellulose, Gradientelution mit 0,01 bis 0,2N NaOH

Präparat	Gewinnung		Viskositätszahl <i>Z</i>	Verteilung der PGS auf die Fraktionen %		
	Verseifungstemperatur °C	Verseifungsdauer Std.		a	b	c
10	20	4	0,56	57	31	12
11	50	0,25	0,13	67	22	11

Alle drei Präparate ergaben drei scharf getrennte Fraktionen. Die Viskositätszahl *Z* der Fraktion a des Präparates 9 betrug 0,59, sie ist also deutlich geringer als die mittlere Viskositätszahl des gesamten Präparates ($Z = 0,74$). Offenbar hat eine Auftrennung nach dem Polymerisationsgrad stattgefunden. Die niedermolekulare Fraktion haftet schwächer. Damit steht im Einklang, dass die stärker abgebauten Pektate 10 und 11 schwächer am Austauscher haften und mit verdünnter NaOH leichter eluierbar sind. Auch bei Heparinen ist gefunden worden, dass die Fraktionen mit niedrigerem Molekulargewicht schwächer am Cellulose-Anionenaustauscher haften⁶⁾.

Die Adsorptionskapazität des positiv geladenen Cellulosederivatives für die negativ geladenen Pektinmakromolekeln betrug nur 20 bis 50 mg PGS pro g DEAE-Cellulose.

Bei allen Trennungen (Tab. 1 bis 3) wurden die aufgetragenen Pektinstoffe praktisch quantitativ zurückgewonnen. An der DEAE-Cellulose haften die Pektinstoffe um so fester, je geringer ihr Gehalt an Seitenketten, je geringer ihr Veresterungsgrad und je höher ihr Polymerisationsgrad ist. Dies zeigt sich sowohl bei der Auftrennung einzelner Pektinpräparate in verschiedene Fraktionen als auch im unterschiedlichen chromatographischen Verhalten von Pektinpräparaten verschiedener bekannter Konstitution. Bei der chromatographischen Auftrennung von Pektinstoffen spielen sicher noch weitere Unterschiede im Aufbau der Makromolekeln eine Rolle. Wegen der Vielzahl wirksamer Faktoren dürfte es nicht immer leicht sein, die Ursache für einen Fraktionierungseffekt anzugeben.

Die Ergebnisse der üblichen Analysen von Pektinpräparaten zeigen oft unklare Beziehungen zu Eigenschaften wie dem Geliervermögen. Die beschriebene chromatographische Fraktionierung dürfte als zusätzliche Charakterisierung nützlich sein. – In der Pektinchemie wäre das Arbeiten mit homogeneren Präparaten erwünscht; es sind deshalb Fraktionierungen im präparativen Maßstab im Gange. Besonderes Interesse verdient das Studium von Pektinfraktionen, die reich an Zucker-Seitenketten sind. Derartige Fraktionen können als «wasserlösliche Protopektine» be-

¹³⁾ H. NEUKOM & H. DEUEL, *Chemistry & Ind.* 1958, 683; Beiheft Z. Schweiz. Forstvereins (Festschrift A. FREY-WYSSLING) 30, 223 (1960).

zeichnet werden. Das in der Zellmembran verankerte Protopektin verdankt seine Unlöslichkeit vielleicht kovalenten Verknüpfungen mit Hemicellulosen und anderen Zellwand-Bestandteilen. Die seitenkettenreichen Pektine tragen noch Reste dieser Vernetzung mit sich.

Experimentelles. – *Zuckerrüben-Na-Pektat* (Präparat 1). 995 g geschälte Zuckerrüben der Sorte *Polybeta* und Ernte 1959 wurden in 70-proz. Alkohol zerkleinert und 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Abfiltrieren, Waschen des Rückstandes mit 70-proz. Alkohol und Trocknen im Vakuum bei 50° wurden 40 g Mark erhalten. Das Mark wurde bei –8° 12 Std. mit 1 l HCl-Alkohol gewaschen und getrocknet. Das gereinigte Mark wurde mit 1N NaOH bei 0° 2 Tage verseift. Aus dem abfiltrierten Mark wurde das Na-Pektat mit 1,5 l siedendem H₂O 15 Min. bei pH 8 extrahiert. Diese Extraktion wurde zweimal wiederholt. Die filtrierten Extrakte wurden vereinigt, im Vakuum konzentriert, und es wurde mit HCl-Alkohol ausgefällt. Nach Waschen mit Alkohol und Trocknen ergaben sich 11,6 g Pektinsäure. Durch Neutralisation mit verd. NaOH wurden daraus wässrige Lösungen von Na-Pektat hergestellt.

Zuckerrüben-Na-Pektate höheren PGS-Gehaltes (Präparate 2 und 3). Je 1 g Präparat 1 wurde in 27,5 ml H₂O + 22,5 ml 0,1N NaOH gelöst. Dann wurde mit 50 ml 0,1N HCl versetzt und bei 35° 8 bzw. 48 Std. stehengelassen. Nach Fällung mit Alkohol wurde der Niederschlag mit Alkohol Cl⁻-frei gewaschen und getrocknet. Im Waschkalkohol fanden sich nach Hydrolyse mit 3-proz. HNO₃ bei 105° viel Arabinose und wenig Galaktose.

Hochverestertes Apfelpektin (Präparat 4). 50 g hochgereinigtes «Rotband»-Pektin der OBI-PEKTIN AG., Bischofszell, mit einem Veresterungsgrad von 35% wurden heterogen bei 2° 14 Tage mit 2 l methanolischer 2N H₂SO₄ verestert. Das Pektin wurde abfiltriert, mit Methanol gewaschen und getrocknet.

Die Präparate 5 bis 8 wurden von der OBI-PEKTIN AG., Bischofszell, geliefert.

Na-Pektate verschiedenen Polymerisationsgrades (Präparate 9 bis 11). Je 2 g Präparat 4 wurden in 100 ml H₂O gelöst und die Lösungen auf die gewünschte Temperatur (Tab. 3) gebracht. Dann wurden je 17 ml 1N NaOH gleicher Temperatur zugegeben und die Mischungen stehengelassen. Anschliessend wurde mit HCl-Alkohol gefällt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet.

Viskositätsmessungen. Die Viskosität von 0,2-proz. Na-Pektat-Lösungen, enthaltend 0,1N NaCl, wurde bei 20,0° in einem Kapillarviskosimeter nach UBBELOHDE (Wasserwert 120 Sek.) gemessen. Viskositätszahl $Z = \eta_{sp}/c$; $c = \text{m}\ddot{\text{A}}\text{q. PGS in 100 ml Lösung}$.

Für die Chromatographie wurde DEAE-Cellulose der BROWN COMPANY, Berlin, N. H., USA, verwendet; Firmenbezeichnung: Reagent grade, Type 20, Lot Nr. 1011; Austauschkapazität: 0,76 mÄq./g. – Die Chromatographie an DEAE-Cellulosekolonnen und die qualitative Papierchromatographie der Zucker¹⁴⁾ erfolgten wie früher beschrieben^{4) 5)}. Der Veresterungsgrad des Pektins wurde durch Titration mit NaOH¹⁵⁾ und der PGS-Gehalt kolorimetrisch mit Carbazol¹⁶⁾ bestimmt.

Wir danken Herrn Dr. W. PILNIK, OBI-PEKTIN AG., Bischofszell, für die Überlassung von Pektinpräparaten. Der EIDGENÖSSISCHEN STIFTUNG ZUR FÖRDERUNG DER SCHWEIZERISCHEN VOLKSWIRTSCHAFT DURCH WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG danken wir für die Kredite, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

SUMMARY

Pectin preparations were fractionated by anion exchange chromatography on DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose columns. The preparations examined by this technique proved to be heterogeneous in their content of non-uronide side groups (consisting of arabinose and galactose units), in their degree of esterification with

¹⁴⁾ M. A. JERMYN & F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.* **64**, 123 (1956).

¹⁵⁾ H. DEUEL, *Ber. schweiz. bot. Ges.* **53**, 219 (1943).

¹⁶⁾ E. A. McCOMB & R. M. McCREADY, *Analyt. Chemistry* **24**, 1630 (1952).

methanol, and in their degree of polymerization. The pectic substances are fixed the more strongly to the cellulose derivative, the lower their content in side groups, the lower their degree of esterification, and the higher their degree of polymerization. This could be verified by studying the chromatographic behaviour of pectin preparations differing in these three mentioned characteristics.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

240. Chromatographie von Pektinen mit verschiedener Verteilung der Methylester-Gruppen auf den Fadenmolekeln¹⁾

16. Mitteilung über Ionenaustauscher²⁾

von **W. Heri**, **H. Neukom** und **H. Deuel**

(25. IX. 61)

Die Methylester-Gruppen des Pektins lassen sich sauer, alkalisch oder enzymatisch verseifen³⁾. Wird mit verschiedenen Mitteln zum gleichen Veresterungsgrad partiell verseift, so entstehen Pektine, die sich deutlich voneinander unterscheiden, so in Bezug auf Löslichkeit, Dissoziation der Carboxylgruppen, Flockbarkeit durch Elektrolyte, Selektivität für Kationen, elektrophoretisches Verhalten, Viskosität, Geliervermögen, Stabilität der restlichen Methylester-Gruppen und Angreifbarkeit durch Pektinenzyme. Man nimmt an, dass diese Unterschiede durch verschiedene inter- und intramolekulare Verteilung der Estergruppen bedingt sind. Mit rein chemischen Methoden hat man diese Annahme noch nicht bewiesen.

Der Mechanismus der Pektinverseifung hängt stark von dem Verseifungsmittel ab. Nach der partiellen Verseifung durch *Säure* dürften die freigelegten COOH-Gruppen weitgehend statistisch verteilt sein. Durch die Säure wird die Dissoziation der COOH-Gruppen des Pektins zurückgedrängt, und dadurch werden intramolekulare elektrostatische Wechselwirkungen herabgesetzt. Bei tiefem pH und tiefer Temperatur kann ohne nennenswerte Nebenreaktionen, wie Spaltung der Glykosidbindungen oder Decarboxylierung, verseift werden⁴⁾. – Bei der partiellen Verseifung durch Alkali dürften die freigelegten COO-Na⁺-Gruppen vorzugsweise einzeln zwischen restlichen COOCH₃-Gruppen verteilt sein. Bei einem Pektin mit einem Veresterungsgrad von 50% dürften die COO-Na⁺- und COOCH₃-Gruppen alternieren. Dies kann aus der Kinetik der alkalischen Verseifung vermutet werden; die «Reaktionskonstante» zweiter Ordnung nimmt im Laufe der Reaktion sehr stark ab, da die Makromolekeln immer stärker negativ aufgeladen werden und die Hydroxyl-

¹⁾ Auszug aus Diss. W. HERI, ETH, Zürich, im Druck.

²⁾ 15. Mitteilung: W. HERI, H. NEUKOM & H. DEUEL, *Helv.* 44, 1939 (1961).

³⁾ G. L. BAKER, *Advances Food Research* 7, 395 (1948); H. DEUEL & E. STUTZ, *Advances Enzymol.* 20, 341 (1958).

⁴⁾ F. WEBER, Diss. ETH, Zürich 1944.