

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.

anionen sich immer schwerer den restlichen COOCH_3 -Gruppen nähern können⁵⁾. Selbst bei tiefen Temperaturen ist ein geringer Pektinabbau während der alkalischen Verseifung kaum zu vermeiden⁶⁾. – Bei der partiellen Verseifung durch *Pektin-esterase* aus Orangen⁷⁾ dürften die freigelegten COOH -Gruppen blockweise beisammen liegen. Das Enzym scheint eine unveresterte COOH -Gruppe neben der angreifbaren COOCH_3 -Gruppe zu benötigen und nebeneinander stehende COOCH_3 -Gruppen nacheinander zu verseifen. Wohl wegen Fehlstellen und Seitenketten an den Pektin-Fadenmolekeln lässt sich Pektin enzymatisch nicht völlig verseifen. Die partielle enzymatische Verseifung dürfte zur grössten Heterogenität in Bezug auf den Veresterungsgrad führen. Man hat in enzymatisch verseiften Pektinpräparaten wiederholt Fraktionen verschiedenen Veresterungsgrades nachgewiesen⁷⁾.

In der vorliegenden Arbeit sollen Pektine, die durch saure, alkalische und enzymatische partielle Verseifung aus dem gleichen hochveresterten Pektin gewonnen wurden, auf ihr chromatographisches Verhalten an Diäthylaminoäthyl-(DEAE)-Cellulose untersucht werden. Dazu wurde das Ausgangspektin mit einem Ver-

Tabelle 1. Charakterisierung der Pektinpräparate

Präparat	Gewinnung	Polygalakturonsäure-Gehalt	Veresterungsgrad	Viskositätszahl
		%	%	Z
4	Ausgangspektin	79	97	1,03
S	partiell sauer verseift	83	55	0,96
A	partiell alkalisch verseift	84	48	0,67
E	partiell enzymatisch verseift	78	56	0,97

Tabelle 2. Fraktionierung von verschiedenartig partiell verseiften Pektinen an DEAE-Cellulose (vgl. Figur)

Präparat	Verteilung der Polygalakturonsäure auf die Fraktionen, %					Veresterungsgrad, %				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
S	6	62	27	1	4	74	54	52	—	22*)
A	2	49	41	1	7	—	52	45	—	13*)
E	24	7	30	3	36	92	87	54	37	24*)

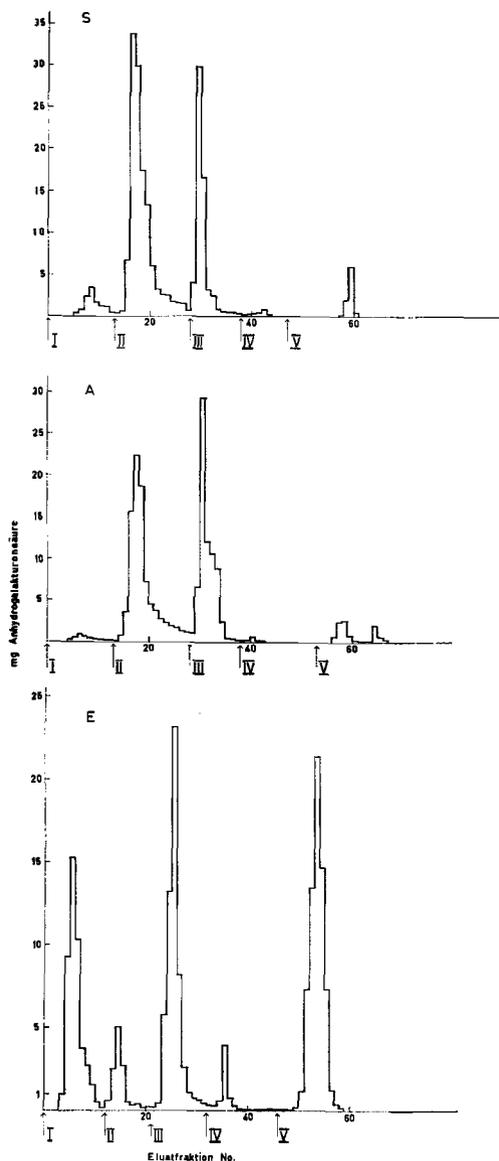
*) berechnet.

⁵⁾ H. DEUEL, Ber. schweiz. bot. Ges. 53, 219 (1943); A. KATCHALSKI & J. FEITELSON, J. Polymer Sci. 13, 385 (1954); E. STUTZ & H. DEUEL, Helv. 38, 1757 (1955).

⁶⁾ B. VOLLMERT, Makromol. Chem. 5, 110 (1950); H. NEUKOM & H. DEUEL, Beiheft Z. Schweiz. Forstvereins (Festschrift A. FREY-WYSSLING) 30, 223 (1960).

⁷⁾ C. H. HILLS, J. W. WHITE & G. L. BAKER, Proc. Inst. Food Technol. 3, 47 (1942); E. F. JANSEN & L. R. MACDONNELL, Arch. Biochemistry 8, 97 (1945); T. H. SCHULTZ, H. LOTZKAR, H. S. OWENS & W. D. MACLAY, J. physic. Chemistry 49, 554 (1945); R. SPEISER, M. J. COPLEY & G. C. NUTTING, *ibid.* 51, 117 (1947); W. H. WARD, H. A. SWENSON & H. S. OWENS, *ibid.* 51, 1137 (1947); R. SPEISER & C. R. EDDY, J. Amer. chem. Soc. 68, 287 (1946); J. SOLMS & H. DEUEL, Helv. 38, 321 (1955).

esterungsgrad von 97% auf annähernd den gleichen Veresterungsgrad von 50% und unter möglichst geringem Abbau verseift (Tab. 1). Die Ergebnisse der Fraktionierungen sind in Tab. 2 und in der Figur zusammengestellt.



Fraktionierung von verschiedenartig partiell verseiften Pektinen an DEAE-Cellulose

Je 200 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 NaH_2PO_4 , V Gradientelution mit 0,1 bis 0,2N NaOH; Volumen der Eluatfraktionen je 20 ml; S mit HCl, A mit NaOH, E mit Pektinesterase verseiftes Pektin.

Die drei partiell verseiften Pektine haften viel stärker am Anionenaustauscher als das hochveresterte Ausgangspektin (Präparat 4²). Es hat eine Fraktionierung nach dem Veresterungsgrad stattgefunden. Beim sauer und beim alkalisch verseiften Pektin machen die Fraktionen II und III ca. 90% aus. Diese weisen einen Veresterungsgrad auf, der nur wenig vom mittleren Veresterungsgrad des Gesamtpräparates abweicht. Bei beiden Pektinen wurden nur kleine Fraktionen mit höherem und mit niedrigerem Veresterungsgrad gefunden. Durch die saure und durch die alkalische Verseifung wurden also bezüglich des Veresterungsgrades recht homogene Produkte erhalten. Die Ergebnisse geben keine Auskunft über die Verteilung der COOH- und COOCH₃-Gruppen längs der Fadenmolekel nach saurer bzw. alkalischer Verseifung.

Ganz verschieden verhält sich das enzymatisch verseifte Pektin. Es ist bezüglich des Veresterungsgrades ausserordentlich heterogen. Nur etwa 30% des Präparates (Fraktion III) haben etwa den gleichen Veresterungsgrad wie das Gesamtpräparat. Etwa 24% des Präparates sind praktisch noch nicht und 36% sind sehr stark verseift. Dieser Befund sagt nichts über eine eventuelle blockweise Anordnung der COOH- und COOCH₃-Gruppen aus. Die Heterogenität deutet darauf hin, dass die enzymatische Verseifung einem «Einzelketten»-Mechanismus gehorcht. Eine Enzymmolekel scheint bevorzugt nacheinander die benachbarten Estergruppen derselben Pektinmolekel zu spalten, ehe sie eine andere Pektinmolekel angreift. – Bei einem anderen Versuch wurde das hochveresterte Ausgangspektin (Präparat 4) mit 10mal weniger Pektinesterase nur zum Veresterungsgrad 75% verseift. Die chromatographische Fraktionierung zeigte, dass der grösste Teil des Präparates noch unverseift und eine kleine Fraktion V nur noch zu 20% verestert war.

Da die Verteilung der COOH- und COOCH₃-Gruppen die Pektineigenschaften wesentlich beeinflussen, dürfte es von Interesse sein, noch empfindlichere chromatographische und andere Methoden zur Ermittlung dieser Verteilung zu entwickeln.

Experimentelles. – *Hochverestertes Ausgangspektin.* Es entspricht dem mit CH₃OH–H₂SO₄ künstlich veresterten, früher beschriebenen Präparat 4²).

Partielle Verseifung mit HCl. 5 g Präparat 4 wurden in 250 ml H₂O gelöst und mit 250 ml 1N HCl versetzt. Die Lösung wurde 96 Std. bei 32° stehengelassen. Dann wurde das Pektin mit Alkohol gefällt, Cl⁻-frei gewaschen und getrocknet (Präparat S).

Partielle Verseifung mit NaOH. 2 g Präparat 4 wurden in 100 ml H₂O gelöst. Die Lösung wurde auf 0° abgekühlt. Die Menge an 0,1N NaOH, die zur partiellen Verseifung auf einen Veresterungsgrad von 50% nötig ist, wurde ebenfalls auf 0° abgekühlt und zur Pektinlösung gegeben, wonach bis zum völligen Verbrauch der NaOH bei 0° stehengelassen wurde. Dann wurde das Pektin mit HCl-Alkohol gefällt, mit Alkohol Cl⁻-frei gewaschen und getrocknet (Präparat A).

Partielle Verseifung mit Orangen-Pektinesterase. 5 g Präparat 4 wurden in 300 ml H₂O gelöst. Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7 gebracht. Dazu wurden 2 g Orangenpektinesterase-Präparat⁸), gelöst in 100 ml H₂O, gegeben. Der pH-Wert wurde während der Verseifung bei Zimmertemperatur ständig durch Zugabe von 0,1N NaOH auf 7 gehalten. Nach Verbrauch von soviel NaOH, als einer partiellen Verseifung auf einen Veresterungsgrad von 50% entspricht, wurde das Pektin mit HCl-Alkohol gefällt, mit Alkohol Cl⁻-frei gewaschen und getrocknet (Präparat E).

⁸) L. R. MACDONNELL, R. JANG, E. F. JANSEN & H. LINEWEAVER, Arch. Biochemistry 28, 260 (1950).

Die analytischen Bestimmungen und die chromatographischen Fraktionierungen erfolgten wie früher beschrieben²⁾).

Der EIDGENÖSSISCHEN STIFTUNG ZUR FÖRDERUNG DER SCHWEIZERISCHEN VOLKSWIRTSCHAFT DURCH WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG danken wir für die Kredite, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

SUMMARY

A 97% esterified pectin was saponified to about the same degree of esterification of 50% by HCl, NaOH, and orange pectin esterase, respectively. The three partially saponified pectins were fractionated by chromatography on diethylaminoethyl-cellulose columns. The pectins saponified by HCl and NaOH were largely homogeneous, but the pectin saponified by enzyme could be separated into large fractions of very different degrees of esterification. Orange pectin esterase seems to de-esterify adjacent COOCH₃ groups of a macromolecule by a single-chain mechanism.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

²⁾ H. NEUKOM, H. DEUEL, W. J. HERI & W. KÜNDIG, *Helv.* 43, 64 (1960).

241. Kationenaustausch an Stärkephosphat¹⁾

17. Mitteilung über Ionenaustauscher²⁾

von F. Wettstein, H. Neukom und H. Deuel

(25. IX. 61)

Die meisten Stärkepräparate adsorbieren Kationen nur bei alkalischer Reaktion³⁾. Die Kartoffelstärke verhält sich wegen eines geringen Gehaltes an PO₄H₂-Gruppen als Kationenaustauscher⁴⁾. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Kationenaustausch an vernetztem Stärkephosphat hoher Austauschkapazität. Dieser Austauscher lässt gegenüber den üblichen Harzen mit SO₃H- und COOH-Gruppen abweichende Ionenselektivitäten erwarten, z. B. eine stärkere Fixierung von Schwermetall-Ionen. Das vernetzte Stärkephosphat besitzt einbasische PO₄⁻-Gruppen (Monoester bei stark saurer Reaktion und Diester) und zweibasische PO₄²⁻-Gruppen (Monoester bei schwach saurer bis alkalischer Reaktion). Die PO₄⁻-Gruppen können mit gewissen Kationen viergliedrige Chelatringe⁵⁾ bilden. Für die Ionenselektivität soll auch die ausgeprägte Polarisierbarkeit⁶⁾ der Phosphorsäuregruppen von Bedeutung sein. An der Ionenfixierung des Stärkephosphates können auch die alkoholischen OH-Gruppen beteiligt sein.

¹⁾ Auszug aus Diss. F. WETTSTEIN, ETH, Zürich 1960.

²⁾ 16. Mitteilung: W. HERI, H. NEUKOM & H. DEUEL, *Helv.* 44, 1945 (1961).

³⁾ H. W. LEACH, T. J. SCHOCH & E. F. CHESSMAN, *Stärke* 13, 200 (1961).

⁴⁾ S. WINKLER, *Stärke* 12, 35 (1960).

⁵⁾ J. A. R. GENGE & J. E. SALMON, *J. chem. Soc.* 1959, 1459.

⁶⁾ P. H. TEUNISSEN & H. G. BUNGENBERG DE JONG, *Kolloid-Beih.* 48, 33 (1938).