

**Zeitschrift:** Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse  
**Band:** 58 (1948)  
**Artikel:** Untersuchungen über die Aktivität der Pektinase  
**Autor:** Matus, J.  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-41315>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 04.10.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Untersuchungen über die Aktivität der Pektinase

Von *J. Matus*

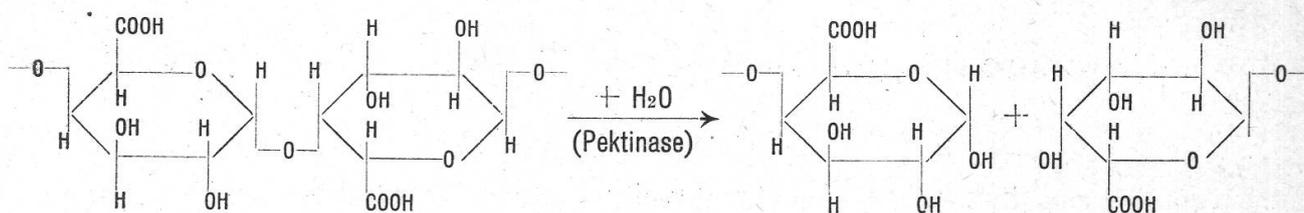
(Aus dem Agrikulturchemischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich. Vorstand: Herr Professor Dr. Hans Pallmann.)

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	Seite
1. Einleitung . . . . .	319
2. Besprechung der Literatur über die Pektinase . . . . .	321
2,1. Nomenklatur und übrige Pektinenzyme . . . . .	321
2,2. Vorkommen und biologische Bedeutung . . . . .	323
2,3. Isolierung . . . . .	329
2,4. Methoden zur Verfolgung des enzymatischen Pektinabbaus . . . . .	330
2,5. Aktivität . . . . .	333
2,6. Verwendung . . . . .	337
3. Materialien und Methoden . . . . .	340
3,1. Pektinstoffe . . . . .	340
3,2. Pektinase . . . . .	343
3,3. Viskosität . . . . .	343
3,4. Aldehyd-Endgruppen . . . . .	347
4. Untersuchungsergebnisse . . . . .	349
4,1. Stabilität der Pektinase . . . . .	349
4,2. Aktivität der Pektinase . . . . .	354
4,21. Einfluß der Wasserstoffionenaktivität, der Temperatur und der Konzentrationsverhältnisse . . . . .	354
4,22. Einfluß von Zusätzen . . . . .	358
4,23. Einfluß des Polymerisationsgrades der Polygalakturonsäure . . . . .	360
4,24. Einfluß des Veresterungsgrades der Polygalakturonsäure . . . . .	361
5. Besprechung der Untersuchungsergebnisse . . . . .	367
5,1. Einfluß verschiedener Faktoren . . . . .	367
5,2. Veresterungsgrad der Polygalakturonsäure . . . . .	370
5,3. Beziehung zwischen Viskosität und Aldehydgruppen . . . . .	371
6. Zusammenfassung . . . . .	374
7. Literatur . . . . .	376

## 1. Einleitung

Die Pektinase ist ein in der Natur weitverbreitetes Enzym. Sie gehört zu den Carbohydrasen, und zwar zu der Untergruppe der Polyasen, die die glykosidischen Bindungen von Polysacchariden und verwandten, hochmolekularen Verbindungen zu hydrolysieren vermögen. Die Pektinase katalysiert spezifisch die Spaltung der  $\alpha$ -glykosidischen Bindungen von Pektinstoffen. Polygalakturonsäure (= Pektinsäure) kann bis zur monomeren d-Galakturonsäure abgebaut werden. Bei der enzymatischen

Pektindegradation entsteht pro gesprengte Glykosidbindung je eine Aldehyd- und eine sekundäre Hydroxylgruppe:



Seit fünfzig Jahren beschäftigen sich in immer steigendem Maße experimentelle Studien mit diesem Ferment, das nicht nur wissenschaftliches, sondern auch technisches Interesse beanspruchen kann. Vor allem durch die Entwicklung der hochmolekularen Chemie, die eine weitgehende Aufklärung des Aufbaues der Pektinstoffe (siehe Zusammenfassung: P a l l m a n n und D e u e l, 1947) gebracht hat, ist die Wirkung der Pektinase heute gut bekannt. Im Vergleich zu vielen andern Enzymen muß jedoch unsere Kenntnis über die Pektinase als recht bescheiden bezeichnet werden. Von den noch zahlreichen ungeklärten Fragen seien einige im folgenden aufgezählt:

1. Wie läßt sich die Pektinase schonend anreichern? Ist sie kristallisierbar?
2. Sind prosthetische Gruppen abtrennbar?
3. Welches sind die aktiven Gruppen des Pektinase-Eiweißes? (Systematische Untersuchung über die Wirkung verschiedenster Enzymgifte.)
4. Unterscheiden sich die Pektinasen verschiedenen Ursprungs?
5. Ist die Pektinase eine  $\alpha$ -Galaktosidase? Kann ein Enzym hochpolymere Pektinsäure bis zur Galakturonsäure abbauen? Welche Beziehungen bestehen zwischen der Konstitution angreifbarer Substrate und der Enzymaktivität? (Substratspezifität.)
6. Wie beeinflussen verschiedene Zusätze die Enzymaktivität? (Kinetik, Reaktionsmechanismus.)
7. Ausarbeitung einer einfachen, einwandfreien Methode zur Aktivitätsbestimmung, möglichst mit einer genau definierten, niedermolekularen Verbindung als Substrat.

Selbstverständlich kann sich die vorliegende Arbeit nur mit einigen wenigen der noch ungelösten Probleme befassen. Zunächst soll ein kurzer Überblick über die bereits recht umfangreiche *Pektinase-Literatur* gegeben werden. Experimentell galt es, den *Einfluß einiger wichtiger Faktoren auf die Aktivität der Pektinase* zu studieren. Besondere Aufmerksamkeit wurde folgenden Faktoren geschenkt: *pH, Temperatur, Elektrolytzusätze, Molekulargewicht und Veresterungsgrad der Pektin-*

*stoffe*. Die enzymatische Hydrolyse wurde durch Bestimmung der Abnahme der *Viskosität* der wäßrigen Lösungen und der Zunahme an *Aldehyd-Endgruppen* verfolgt.

## 2. Besprechung der Literatur über die Pektinase

### 2.1. Nomenklatur und übrige Pektinenzyme

Es existieren bereits verschiedene *Zusammenfassungen* über die Pektinase und die Pektinenzyme im allgemeinen: Oppenheimer (1924); Waksman und Davison (1926); Ehrlich (1927); Willaman (1927); Euler (1928); Ehrlich (1936); Kertesz (1936); Cruess (1938); Mehltz (1938); Bock (1941); Mehltz (1941); Tauber (1943); Hansen (1944); Weber und Deuel (1945); Rogers (1946); Phaff und Joslyn (1947); Weber, Matus und Schubert (1947).

Als *Entdecker* der Pektinase können Bourquelot und Hérissey angesehen werden, die 1898 in keimender Gerste ein Enzym fanden, das Pektin hydrolytisch abbaut. Die Bezeichnung Pektinase stammt auch von diesen beiden französischen Forschern. Die Wirkung der Pektinase war wohl schon früher öfters beobachtet worden; man sprach von einer Cytase (Enzymgemisch), die Zellmembransubstanzen anzugreifen vermag (De Bary, 1886; Ward, 1888; Brown und Morris, 1890; Green, 1895; Arthur, 1897).

Die *Nomenklatur* der Pektinase oder besser der Pektinasen ist uneinheitlich. Oft werden die Bezeichnungen anderer Pektinenzyme fälschlicherweise verwendet. Ehrlich (1932) nennt die Pektinase *Pektolase*, Kertesz (1936) *Polygalakturonase*. In dieser Arbeit soll die Bezeichnung der Entdecker beibehalten werden. — Manchmal werden auch die Pektinenzyme im allgemeinen mit Pektinase bezeichnet.

Kurz sollen noch die beiden *anderen Pektinenzyme*, die Protopektinase und die Pektase, besprochen werden, da sie beim Studium der Pektinase oft zu berücksichtigen sind.

Die *Protopektinase*, deren Angriffsweise unbekannt ist, verwandelt das wasserunlösliche Protopektin der pflanzlichen Zellmembran in wasserlösliches Pektin. Da das Protopektin (nach Tschirch) teils auch als Pektose (nach Frémy) bezeichnet wird, hat dieses Enzym auch den Namen Pektosinase (Beijerinck und van Delden, 1904) oder Pektosase (Chateau, 1909) erhalten. Auch von Propektinase wird zuweilen gesprochen. Nach Davison und Willaman (1927) soll die Protopektinase ein höheres pH-Optimum und eine geringere Hitzeresistenz als die Pektinase besitzen. Oft wird jedoch angenommen, daß die Protopektinase mit der Pektinase identisch sei. Es scheint sichergestellt zu sein, daß durch Pektinase eine Degradation von Proto-

pektin erfolgen kann. So wird z. B. nach Griffin und Kertes z (1946) Apfelgewebe durch Pektinase-Einwirkung weich. Dadurch läßt sich jedoch die Identität zwischen Pektinase und Protopektinase nicht beweisen; denn es ist durchaus denkbar, daß auch durch Sprengung anderer Bindungen als der glykosidischen der Polygalakturonsäure ein Zerfall des Protopektins bewirkt wird. In Früchten, die natürlicherweise beim Reifen oder Lagern erweichen, ließ sich bisher keine Pektinase nachweisen. In Tomaten konnte Pektinase nachgewiesen werden. Da die Art der Verankerung der Pektinstoffe in der Zellmembran (als Protopektin) unbekannt ist, weiß man bisher auch nicht, was für Bindungen bei der Protopektin-Pektin-Metamorphose gespalten werden. Es wäre beispielsweise möglich, daß die Protopektinase eine Hemizellulase ist, die die im Gewebe mit Pektin verknüpfte Hemizellulose hydrolysiert. — Auf diesem Gebiet sind also noch eingehende Studien notwendig. — Die Protopektinase soll bei der Faserröste und allgemein bei der fermentativen Mazeration pflanzlicher Gewebe von Bedeutung sein.

Besser ist man über die von Frémy (1840) in der Karotte entdeckte *Pektase* unterrichtet. Dieses Ferment wird auch als Pektin-Demethoxylase oder Pektin-Esterase bezeichnet. Die Pektase verseift Pektin und Protopektin unter Abspaltung von Methanol. Da bei dieser Hydrolyse Karboxylgruppen frei werden, läßt sich die Enzymwirkung durch Titration mit Lauge bestimmen. Wahrscheinlich ist dieses Enzym bedeutend spezifischer, als bisher meist angenommen wurde; sicher ist es mit gewöhnlicher Lipase, die Fette spaltet, nicht identisch. Glykol- und Glycerinester der Polygalakturonsäure werden durch Pektasen verschiedenen Ursprungs nicht verseift (Deuel, 1947). Pektase findet sich u. a. in Klee, Luzerne, Kartoffelkraut, Fliederblättern, Tabak, Tomate, Zitrusfrüchten, Karotte, Carica Papaya und bei verschiedensten Mikroorganismen. Viele Pilze, die Pektinase bilden, produzieren auch Pektase (z. B. Davison und Willaman, 1927; Fish und Dustman, 1945; Gäumann und Böhni, 1947; Phaff, 1947). Das Verhältnis von Pektinase zu Pektase variiert sehr stark. — Hier ist von besonderem Interesse, daß die Pektase die enzymatische Degradation von Pektinmakromolekülen beeinflussen kann (Bourquelot, 1899; Jansen, Macdonnell und Jang, 1945). Durch Verseifung des Pektins kann die Pektinase rascher wirken. Auch eine eventuelle Ansäuerung der Reaktionslösung begünstigt den Abbau durch Pektinase. Bewirkt die Pektase jedoch bei Gegenwart von Salzen mehrwertiger Kationen eine Ausflockung des gebildeten, niederveresterteren, elektrolytempfindlicheren Pektins, so ist dann das Pektin vor dem Angriff durch die Pektinase weitgehend geschützt. — Das pH-Optimum der Pektase höherer Pflanzen liegt in der Nähe des Neutralpunktes. Die Pektase von Pilzen besitzt ein deutlich tieferes pH-Optimum von 4,3 bis 4,4 (Fish und Dustman, 1945; Phaff, 1947). Die fermentative

Pektinverseifung ist bei der Selbstklärung von Fruchtsäften von Bedeutung. — Die umfangreiche Literatur über die Pektase soll hier nicht besprochen werden.

## 2.2. Vorkommen und biologische Bedeutung

Die *Pektinase* ist ein bei den *Thallophyten* sehr weit verbreitetes Enzym. Die vorhandene Fermentmenge kann von Rasse zu Rasse sehr stark variieren (P r o s k u r j a k o w und O s s i p o w, 1939). — Seltenere und in geringerer Menge ist die Pektinase bei *höheren Pflanzen* anzutreffen; im Tierreich wurde sie bisher nur bei wenigen *Schnecken* gefunden.

Sicher sind die Pektinasen verschiedener Organismen nicht miteinander identisch; bereits die stark verschiedenen *pH*-Optima weisen darauf hin. Vielleicht bilden manche Organismen sogar verschiedene Pektinasen.

Die Menge der gebildeten Pektinase hängt bei Mikroorganismen von den Wachstumsbedingungen ab. Bei Pilzkulturen ist die Pektinase teils an das Mycel gebunden, teils befindet sie sich frei in der Nährlösung. Das Verhältnis von intra- zu extrazellulärem Enzym variiert in weiten Grenzen (H a r t e r und W e i m e r, 1921 und 1923; W i l l a m a n und K e r t e s z, 1931; W e b e r und D e u e l, 1945). Der von P h a f f (1943 und 1947) untersuchte Stamm von *Penicillium chrysogenum* bildete fast ausschließlich extrazelluläre Pektinase. Wiederholt wurde beobachtet, daß die Zusammensetzung der Nährlösung die Pektinasebildung beeinflußt (M e n o n, 1934; F e r n a n d o, 1937). P h a f f (1943 und 1947) stellte fest, daß Ammonium-Stickstoff günstiger wirkt als andere Stickstoffquellen wie z. B. Nitrate, Glykokoll und Alanin. Über die Wirkung von Pektinstoffen in der Nährlösung liegen sich widersprechende Befunde vor, die wohl auf die Verwendung verschiedener Pilzarten und -stämmen zurückgeführt werden dürften. W i l l a m a n und K e r t e s z (1931) konnten keine Stimulation der Pektinasebildung durch Pektin feststellen. Auch G ä u m a n n und B ö h n i (1947) betrachten die Pektinase bei *Aspergillus niger* und *Botrytis cinerea* im Gegensatz zur Pektase als konstitutives Enzym. Nach H a r t e r und W e i m e r (1921 und 1923), P r o s k u r j a k o w und O s s i p o w (1939) und B a r i n o w a (1946) wird bei verschiedenen Pilzen die Bildung der Pektinase durch Pektin im Nährsubstrat sehr stark gefördert. — Bei *Penicillium chrysogenum* sind nach P h a f f (1947) nur Pektin, Pektinsäure, d-Galakturonsäure, Schleimsäure, l-Galaktonsäure und Tragant geeignete C-Quellen für reichliche Pektinasebildung. Tragant, der d-Galakturonsäure enthält, wird jedoch von der Pektinase selbst kaum angegriffen. Viele andere von P h a f f geprüfte Verbindungen führten nur zur Bildung von Spuren Pektinase, selbst wenn üppiges Pilzwachs-

tum eintrat. P h a f f bezeichnet Pektinase und Pektase bei *Penicillium chrysogenum* als adaptive Enzyme. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß eine scharfe Definition der Begriffes « adaptives Enzym » große Schwierigkeiten bereitet.

In der folgenden Übersicht wurde versucht, die wichtigsten Organismen, bei denen nach den Angaben der Literatur die Pektinase mit großer Wahrscheinlichkeit anzutreffen ist, zusammenzustellen. Dabei ist eine Ausscheidung der immer noch hypothetischen Protopektinase nicht möglich. Oft wird auf Pektinase nicht aus Versuchen an reinem Pektin, sondern aus Beobachtungen über Gewebezzerfall (z. B. an Kartoffelstücken, Auflösung der Mittellamelle) geschlossen. Häufig wird angenommen, daß die Protopektinase bei höheren Pflanzen verbreitet ist (siehe K e r t e s z , 1936). So wird das Weichwerden von Früchten z. B. auf die Wirkung der Protopektinase zurückgeführt. Da bisher jedoch der Nachweis von Pektinase in weichwerdenden, nicht infizierten Früchten nicht erbracht werden konnte, wurden derartige Angaben der Literatur nicht berücksichtigt. Es sei erwähnt, daß H a n e s und M o r r i s (1938) beim Reifen von Pflaumen eine Verminderung der Viskosität des löslichen Pektins feststellten. Der exakte Pektinase-Nachweis bei höheren Pflanzen wurde bisher nur selten erbracht. Geringe Mengen dieses Enzyms wurden in reifen Tomaten gefunden (K e r t e s z , 1938; M a c d o n n e l l , J a n s e n und L i n e w e a v e r , 1945). Zur Gewinnung pektinasefreier Pektase ist Orangen-Flavedo besser als die Tomate geeignet.

Zusammenstellungen über die Verbreitung der Pektinase finden sich bereits bei T h a y s e n und B u n k e r (1927); S j ö b e r g (1933); B e r n a u e r und K n o b l o c h (1941) und B o c k (1941). — Die mehr oder weniger zufälligen Einzelbeobachtungen, die in der folgenden Übersicht<sup>1</sup> zusammengestellt sind, geben natürlich über die tatsächliche Verbreitung des Enzyms keine Auskunft. Eine systematische Arbeit über das Vorkommen der Pektinase in der Natur liegt bisher wohl nicht vor. — Erwähnt sei, daß bei den technisch wichtigen Hefen, im Speichel und im Magen- und Pankreassaft von Wirbeltieren keine Pektinase nachgewiesen werden konnte. Amylasepräparate, die aus Malz, Bakterien oder Schimmelpilzen gewonnen wurden, zeigen meist eine geringe Pektinase-Aktivität (D a v i s o n und W i l l a m a n , 1927; E h r l i c h , 1936; B a k e r , 1936; T a u b e r , 1943).

---

<sup>1</sup> Herrn Dr. O. Richard (Institut f. landw. Bakteriologie an der ETH) und Herrn Dr. L. Ettliger (Institut f. spezielle Botanik an der ETH) bin ich für die Hilfe bei der Klassifikation der Mikroorganismen zu Dank verpflichtet. Die Systematik der Bakterien erfolgte nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (5. Auflage, 1939), diejenige der Pilze nach E. G ä u m a n n , Vergleichende Morphologie der Pilze (1926).



C. Pilze

Phycomycetes

Oomycetes

- Pythium de Baryanum* . . . . . Pitman und Cruess, 1929;  
Chona, 1932; Menon, 1934;  
Fernando, 1937.
- Phytophthora erythroseptica* . . . Menon, 1934; Chona, 1932.

Zygomycetes

- Mucor* sp. . . . . Harter, 1925; Korsakowa und  
Nikitin, 1933; Proskurjakow  
und Ossipow, 1939.
- M. racemosus*  
*M. stolonifer*  
*M. piriformis*  
*M. hiemalis*
- Rhizopus* sp. . . . . Harter und Weimer, 1921 u. 1923;  
Weimer und Harter, 1923;  
Davison und Willaman, 1927;  
Proskurjakow und Ossipow,  
1939.
- R. nigricans*  
*R. tritici*  
*R. artocarpi*  
*R. chinensis*  
*R. microsporus* usw.

Ascomycetes

Endomycetales

- Byssochlamys fulva* . . . . . Olliver und Rendle, 1934.

Plectascales

- Aspergillus* sp. . . . . Gærtner, 1919; Davison und  
Willaman, 1927; Ehrlich, 1927;  
Gortner, 1929; Mehlitz, 1930;  
Fellers, Clague und France,  
1933; Grassmann usw., 1933;  
Popowa, 1935; Nowotelnow u.  
Barkowskaja, 1935; Maxi-  
menko, 1937; Kalliski usw., 1938;  
Matida und Tasiro, 1939;  
Proskurjakow und Ossipow,  
1939; Serbinowa, 1939; Gäu-  
mann und Böhni, 1947.
- Penicillium* sp. . . . . Gærtner, 1919; Pitman und  
Cruess, 1929; Kertesz, 1930;  
Klebahn, 1930 und 1933; Willa-  
man u. Kertesz, 1931; Ehrlich,  
1932; Popowa, 1935; Ehrlich und  
Hänsel, 1936; Hübler, 1940;  
Jirak u. Niederle, 1941; Kung-  
Hsiang, 1942; Phaff, 1943 u. 1947;  
Isbell und Frush, 1944.
- P. luteum*  
*P. expansum*  
*P. chrysogenum*  
*P. notatum*  
*P. Ehrlichii*  
(*P. glaucum*, ?)

Sphaeriales

- Chaetomium globosum* . . . . . Stuart und Emsweller, 1943.
- Glomerella cingulata* . . . . . Menon, 1934.  
(*Gloeosporium fructigenum*)

Pezizales

- Sclerotinia* sp. . . . . Smith, 1902; Brown, 1915/1917;  
*S. cinerea* . . . . . Harter und Weimer, 1923;  
*S. minor* . . . . . Muhlemann, 1925; Davison und  
*S. fructigena* (*Monilia fructigena*) . . . . . Willaman, 1927; Menon, 1934;  
*S. Fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) . . . . . Popowa, 1935; Vasudewa, 1930;  
 Fernando, 1937; Proskurjakow und Ossipow, 1939; Jones, 1946; Gäumann und Böhni, 1947

Basidiomycetes

Polyporales

- Lenzites sepiaria* . . . . . Zeller, 1916.  
*Stereum purpureum* . . . . . Mayo, 1925.  
*Polyporus* sp. . . . . Bose u. Sakar, 1937; Bose, 1938.

Fungi imperfecti

- Fusarium* sp. . . . . Bruschi 1912; Sideris, 1924;  
*F. niveum* . . . . . Chona, 1932; Menon, 1934; Fuller und Norman, 1946.  
*F. lycopersici* . . . . .  
*F. chromiophthoron* . . . . .  
*F. fructigenum* usw. . . . .  
*Alternaria* sp. . . . . Ruschmann und Bartram, 1940.  
 Fuller und Norman, 1946.  
*Cephalosporium* sp. . . . . Fuller und Norman, 1946.  
*Cladosporium* sp. . . . . Korsakowa und Nikitin, 1933.  
*Hormodendrum* sp. . . . . Fuller und Norman, 1946.  
*Metarrhizium* sp. . . . . Stuart und Emsweller, 1943.  
*Phoma* sp. . . . . Fuller und Norman, 1946.  
*Trichothecium roseum* . . . . . Fuller und Norman, 1946.

D. Blütenpflanzen

- Keimende Getreidekörner . . . . . Bourquelot und Hérissé, 1898;  
 Gerste, Malz . . . . . Chateau, 1909; Willaman, 1928;  
 Baker, 1936.  
 Tomate . . . . . Kertesz, 1938; Macdonnell,  
 Jansen und Lineweaver, 1945.  
 Rosaceen-Samen . . . . . Ehrlich, 1932; Grassmann usw.,  
 Bittere Mandeln (*Emulsin*) . . . . . 1933; Hajo, 1940.  
 Kaffeebohne . . . . . Perrier, 1931.  
 Bei der Fermentation (?) . . . . .  
 Pollenkörner . . . . . Green, 1895; Paton, 1921;  
 z. B. *Lythrum salicaria* . . . . . Schoch-Bodmer und Huber,  
 1945 und 1947.

E. Tiere

Mollusken

Gastropoden

- Helix pomatia* . . . . . Hoesslin, 1911; Ehrlich, 1932;  
 (Hepato-Pankreassaft . . . . . Colin und Chadun, 1935; Ehrlich,  
 der Weinbergschnecke) . . . . . 1936; Fabergé, 1945.  
*Torbo cornutus* . . . . . Mori und Tokutaro, 1940.  
 (Wasserschnecke, in den . . . . .  
 Eingeweiden) . . . . .

Die weite Verbreitung der Pektinase ist verständlich, wenn man bedenkt, daß wohl alle höheren Pflanzen Pektinstoffe enthalten (in der Mittellamelle, in der primären Zellmembran und in gelöster Form). Die Pektinase dürfte den Abbau der hochpolymeren Pektinstoffe einleiten. Ob diesem Enzym auch beim Aufbau vom Pektin eine Bedeutung zukommt, ist unbekannt, aber wenig wahrscheinlich.

Bei der *Zersetzung von Pflanzenmaterial im Boden* (z. B. Düg-geli, 1923 und 1937; Stöckli, 1928) und im Stallmist (z. B. Flieg, 1930; Ruschmann, 1936) sind auch Pektinasen, die von verschiedenen Mikroorganismen gebildet werden, am Werk. Sehr reich soll Regenwurm Kot an Pektinvergärem sein. Auch bei der *Faserrotte* von Hanf, Lein usw. ist der enzymatische Pektinabbau zur Freilegung der Zellulosefasern von Bedeutung (z. B. Beijerinck und Van Delden, 1904; Rossi und Carbone, 1908; Omelianki und Komonowa, 1926; Orla-Jensen und Kluyver, 1939; Ruschmann und Bartram, 1940 und 1942; Henk, 1941; Bonnet, 1943; Allen, 1944; Fuller und Norman, 1946).

Da der Mensch und die Wirbeltiere keine Pektinase produzieren, sind die Pektinstoffe erst dank der *pektolytischen Tätigkeit der Darmflora* verdaulich (Ehrlich, 1930; Baker und Martin, 1937; Kertesz, 1940; Werch und Mitarbeiter, 1940—1943). Die Pektinzersetzung vollzieht sich erst im Dickdarm. Durch Zusatz von Faeces zu Pektinlösungen kann ein rascher Abbau der Pektine beobachtet werden. Über die Pektinverdauung bei Wiederkäuern sind wohl keine Untersuchungen veröffentlicht worden.

Sehr vielen *phytopathogenen Mikroorganismen*, vor allem Pilzen, dient die Pektinase als Wegbereiter einer Infektion. Es liegen hier zahlreiche Beobachtungen von Krankheiten bei Kartoffeln, Rüben, Früchten usw. vor (Jones, 1905 und 1909; Scharding, 1905 und 1907; Brown, 1915; Weimer und Harter, 1923; Davison und Willaman, 1927; Vasudewa, 1930; Chona, 1932; Menon, 1934; Fernando, 1937; Allen, 1944; Gäumann und Böhni, 1947). Auch bei der Holzfäulnis durch *Polyporus* sp. scheint der Pektinase eine gewisse Bedeutung zuzukommen (Bose und Sakar, 1937; Bose, 1938).

Sicher hat die Pektinase höherer Pflanzen eine wichtige physiologische Aufgabe zu erfüllen. Das *keimende Getreidekorn* braucht dieses Enzym zur Zerstörung der Zellmembranen. Die Bedeutung der *Emulsin-Pektinase* ist nicht bekannt. Ob die Pektinase bei der Kaffeefermentation (Perrier, 1931) von der Kaffeebohne oder von Mikroorganismen stammt, erscheint nicht abgeklärt.

Von Interesse sind die Pektinenzyme, die von den *Pollen* gebildet werden und die kollenchymatischen, pektinhaltigen Wandverdickungen

des Griffels (*Lythrum salicaria*; Schoch-Bodmer und Huber, 1945 und 1947) auflösen.

Die Pektinasen haben teils ähnliche Funktionen zu erfüllen wie die Hyaluronidasen («spreading factor»). Die letzteren sind bei der Permeabilitätserhöhung tierischer Gewebe und beim Auflösen tierischer Schleime (Hyaluronsäuren) von Bedeutung. Sie führen auch durch Hydrolyse glykosidischer Bindungen zum Abbau von fadenförmigen Makromolekülen. Pektinasen werden von Pollenkörnern und phytopathogenen Mikroorganismen gebildet, Hyaluronidasen finden sich im Sperma und bei zoopathogenen Mikroorganismen.

### 2.3. Isolierung

Über die Gewinnung hochaktiver Pektinasepräparate finden sich kaum Angaben in der Literatur. Eine *Reindarstellung* des Enzyms in kristalliner Form wurde bisher nicht beschrieben. Dagegen wurden die in der Enzymologie üblichen Anreicherungsverfahren wiederholt verwendet. Als Ausgangsmaterialien kommen die verschiedensten pektinasehaltigen Materialien in Frage, meist werden jedoch die Kulturen von *Schimmelpilzen* zur Gewinnung von Pektinasepräparaten herangezogen. Dies gilt besonders für die vielen technischen Produkte wie zum Beispiel Pectinol, Filtragol, Filtral, Pectasin, Pectoclarol, Uvaclarol und Ido (Wallerstein, 1939). Isbell und Frush (1944) schlagen die Abfallflüssigkeit von der Penicillinfabrikation als billige Pektinasequelle vor.

Die Entdecker der Pektinase, Bourquelot und Hérissé (1898), behandelten getrocknete Gerstenkeimlinge bei 30—35° C mit chloroformhaltigem Wasser während 12 Stunden. Darauf wurde abgepreßt und der Preßsaft klar filtriert. Anschließend wurde etwa die doppelte Menge Alkohol zugesetzt. Im Niederschlag, der auf der Nutsche abfiltriert wurde und noch mit Alkohol und Äther gewaschen wird, befindet sich das Enzym. Der Niederschlag wurde dann noch im Vakuum getrocknet. Zur Fällung werden oft auch Aceton und verschiedene Elektrolyte wie Ammonsulfat oder Ammonphosphat benutzt. An Stelle der Fällung trocknen Davison und Willaman (1927) die Extrakte direkt im Vakuum ein. Eine Reinigung der enzymhaltigen Lösungen durch Adsorption, Chromatographie, Dialyse oder Elektrodialyse wurde bisher nur selten vorgenommen (Graßmann und Mitarbeiter, 1933). Nach Ehrlich (1937) sollen Kulturen von *Penicillium Ehrlichii* besonders aktive Pektinase-Trockenpräparate liefern. Als Beispiel sei die Arbeitsweise Ehrlichs bei der Kultivierung des Schimmelpilzes und der Isolierung des Rohenzymes kurz geschildert:

In einer Mischung von 1600 cm<sup>3</sup> Hefewasser (mit zirka 1 % Trockensubstanz) und 400 cm<sup>3</sup> Malzauszug (spezifisches Gewicht zirka 1,04) werden 40 g Zitruspektin aufgelöst. Die sterilisierte Lösung wird mit einer

frischen, auf Würzeagar gewachsenen Reinkultur des Pilzes *Penicillium Ehrlichii* beimpft. Nach 23tägigem Wachstum des Pilzes bei 22—25° C wird die entstandene starke Myceldecke herausgehoben, durch Zerreiben im Mörser gut zerkleinert und der Nährflüssigkeit wieder zugesetzt. Die gesamte Mischung wird nach Zugabe von 60 cm<sup>3</sup> Toluol noch 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, damit auch noch das Enzym im Mycel in die Flüssigkeit diffundieren kann. Darauf saugt man die Mycelflocken auf einer Nutsche ab und wäscht mit wenig Wasser nach. Die geklärten Filtrate werden mit dem vierfachen Volumen 96-prozentigem Äthylalkohol versetzt, der entstandene flockige Niederschlag wird nach dem Absetzen abfiltriert, auf der Nutsche mit Alkohol und Äther gewaschen und im Exsiccator über Kalziumchlorid getrocknet. Es wurden 11,1 g eines fast farblosen Pulvers erhalten.

Die bisher gewonnenen Pektinasepräparate enthalten fast stets noch verschiedene andere Fermente wie Amylase, Proteinase, Invertase und Pektase (Fish und Dustman, 1945). Die verschiedene *Säureempfindlichkeit der Pektinase und Pektase* wurde von Rothschild (1938/39) zur Trennung vorgeschlagen. Jansen und Macdonnell (1945) inaktivierten die vorhandene Pektase durch Behandeln des Pektinasepräparates während zirka 20 Minuten bei 20° C mit Mineralsäure von pH 0,6. Die Pektinase wurde dann aus der Lösung durch 85-prozentige Sättigung mit Ammonsulfat ausgefällt. Der Niederschlag wurde gelöst und die filtrierte Lösung für die weiteren Versuche verwendet. Bei dieser Arbeitsweise tritt eine erhebliche Inaktivierung der Pektinase ein. Vielleicht wird nach der Meinung der beiden amerikanischen Autoren von zwei vorhandenen Pektinasen nur die säurelabilere zerstört. Schon früher beobachtete Fernando (1937), daß selbst schon bei pH 3 eine allmähliche Inaktivierung eintrat. Sicher arbeitete er mit einer säureempfindlicheren Pektinase. Interessant erscheint seine Beobachtung, daß nach der Säurebehandlung das pH-Optimum der Pektinase nach einer saureren Reaktion verschoben war. Zur Pektaseentfernung perkolierten McCulloch und Kertesz (1945) die Enzymlösung durch eine Säule eines Kationenaustauschers (Amberlite IR 100). Die Adsorption erfolgte bei einem pH, bei dem die Pektase in kationischer, die Pektinase aber noch in anionischer Form vorliegt.

#### 2.4. Methoden zur Verfolgung des enzymatischen Pektinabbaus

Zur Verfolgung des enzymatischen Pektinabbaus ist eine große Anzahl von Methoden in der Literatur beschrieben worden, von denen die wichtigsten im folgenden kurz besprochen werden sollen:

- a) *Aldehyd-Endgruppen*: Diese Bestimmung liefert ein direktes Maß für den Umfang der eingetretenen fermentativen Reaktion, da bei jeder einzelnen Spaltung eine Aldehydgruppe frei wird. Für

einen geringen Abbau sind jedoch Messungen der Abnahme der Viskosität oder des Geliervermögens bedeutend empfindlicher. Bereits Bourquelot und Hérissey (1898) benutzten die Ermittlung der Zunahme an reduzierenden Gruppen zum Nachweis der Pektinase. Neben der Bestimmung nach Fehling wird vor allem die Methodik von Willstätter und Schudel (1918) verwendet (Willaman, 1928; Graßmann und Mitarbeiter, 1933; Mehltitz und Scheurer, 1935; Colin und Chaudun, 1936; Ehrlich, 1937; Kertesz, 1939; Hübler, 1940; Fish und Dustman, 1945; Jansen und Macdonnell, 1945; Jansen, Macdonnell und Jang, 1945; Deuel und Weber, 1945).

- b) *Optische Aktivität:* Mit Erfolg hat Ehrlich (1932—1937) in seinen zahlreichen Untersuchungen diese Methode angewandt, auch Fish und Dustman (1945) bestimmten die Wirkung der Pektinase auf polarimetrischem Wege. Die Ermittlung der optischen Aktivität verdient sicher ein eingehenderes Studium. In Verbindung mit anderen Untersuchungsverfahren kann sie eventuell näheren Aufschluß über die Art des Pektinangriffes liefern. Günstig erscheint, daß die hochpolymere Pektinsäure ein  $[\alpha]_D^{20}$  von  $+280$  bis  $+290^\circ$  besitzt, währenddem die monomere Galakturonsäure nur ein  $[\alpha]_D^{20}$  von  $+50,9$  bis  $+51,9^\circ$  aufweist.
- c) *Fällbarkeit:* Je stärker das Pektin enzymatisch abgebaut ist, desto schwerer läßt es sich durch organische Lösungsmittel wie Alkohol und Azeton oder durch Elektrolyte aus der wäßrigen Lösung ausfällen. Auch die Koagulation nach Verseifung mit Pektase in Gegenwart von Erdalkalisalzen erfolgt um so unvollständiger, je geringer die Kettenlänge des Pektins ist. Fällungsreaktionen sind jedoch eher zur ungefähren Abschätzung des Pektinabbaues geeignet; die Ausarbeitung quantitativer Methoden stößt auf große Schwierigkeiten. Bereits aus der Art des Niederschlages nach Zusatz des Fällungsmittels kann der Umfang der Pektolyse beurteilt werden. Gelatinöse und faserige Niederschläge sind ein Zeichen für hochpolymeres Pektin, das Auftreten feiner Flocken und die Erscheinung der Opaleszens läßt auf stärkere Hydrolyse des Pektins schließen. Für viele praktische Zwecke ist eine solche vergleichende Beurteilung von Niederschlägen genügend. Eingehende Studien über Fällungstitrationen sind bisher nicht angestellt worden. Überhaupt sind unsere Kenntnisse über die Koagulation von Pektinstoffen recht bescheiden. Es sind immerhin Methoden in der Literatur angegeben worden, die die Fällbarkeit zur Verfolgung der fermentativen Hydrolyse verwenden. So bestimmten McCulloch und Kertesz (1945) das Volumen der aus den Pektinen gebildeten Pektinsäure mit Hilfe der Zentrifugenmethode

von Fellers und Rice (1932). Mehltitz und Maaß (1935) verfolgten die Pektindegredation nach der Kalziumpektatmethode von Carré und Haynes (1922). Je mehr die fermentative Hydrolyse fortgeschritten ist, desto weniger Kalziumpektat läßt sich ausfällen. Nach den heutigen Kenntnissen ist dieses Vorgehen als unbefriedigend zu bezeichnen. Bereits ohne Abnahme der Menge an Kalziumpektat kann eine Enzymwirkung stattgefunden haben. Andererseits tritt bereits keine Fällung bei Abbauprodukten auf, die noch längst nicht die monomeren Bausteine darstellen (Proskurjakow und Ossipow, 1939; Phaff, 1947).

d) *Viskosität*: Am häufigsten hat man die rasch bestimmbare Abnahme der Viskosität wäßriger Pektinlösungen bestimmt, um die Wirkung der Pektinase zu ermitteln (zum Beispiel Mehltitz und Scheurer, 1934; Ehrlich, 1937; Matida und Tasiro, 1939; Kertesz, 1939; Zimmermann, Malsch und Weber, 1939; Hübler, 1940; Mehltitz, 1941; Jansen und Macdonnell, 1945; Weber und Deuel, 1945; Deuel und Weber, 1945; Weitnauer, 1946; Pallmann, Matus, Deuel und Weber, 1946; Deuel und Weber, 1946; Weber, Matus und Schubert, 1947). Für kinetische Untersuchungen müssen die viskosimetrischen Bestimmungen mit Vorsicht verwendet werden, da die Beziehung zwischen Viskosität und Molekulargewicht nicht bekannt ist und sicher wegen der Polydispersität von Fall zu Fall eine verschiedene sein dürfte. Außerdem ist stets zu beachten, daß die Viskosität außer vom Molekulargewicht noch von vielen anderen Faktoren beeinflußt wird. So empfehlen Deuel und Weber (1945), die Viskosität stets erst nach völliger Verseifung zu Natriumpektat in verdünnter Natronlauge zu messen. Wegen deutlicher Abweichungen vom Hagen-Poiseuille'schen Gesetz hat auch das verwendete Viskosimeter Einfluß auf die Resultate. Schneider und Bock (1938) bestimmten die Viskosität der azetonischen Lösungen von Nitropektin. Diese Methode erscheint jedoch zur Beurteilung der enzymatischen Hydrolyse recht umständlich; sie bietet auch gegenüber Messungen an wäßrigen Lösungen keine Vorteile.

Der Viskositätsuntersuchung steht die Bestimmung der *Filtrationsgeschwindigkeit* wäßriger Pektinlösungen nahe. Für gewisse Fälle kann auch die Abnahme der *Gelierfähigkeit* als sehr empfindliche Methode herangezogen werden (Deuel und Weber, 1945). Sizer (1946) hat die *Klebkraft* von Pektinstoffen zur Aktivitätsbestimmung von Pektinasepräparaten verwendet. Nach Pilnik (1946) ist die Ermittlung der *Strömungsdoppelbrechung* wäßriger Pektinlösungen zur Bestimmung der Pektolyse wenig geeignet. Auch die *Verflüssigung von Pektin Gelen* kann zum Nach-

weis der Pektinase dienen (Jones, 1946). Die Beobachtung des Zerfalls pflanzlicher Gewebe (Kartoffel, Karotte usw.) dient häufig zum Studium der « Protopektinase ».

e) *Farbreaktionen*: Charakteristisch für einen fortschreitenden Pektinabbau ist die Intensivierung der Orange-Rot-Färbung nach Erhitzen mit Bleiazetat (Ehrlich, 1932). Die monomere Galakturonsäure liefert eine intensive Ziegelrotfärbung.

Bei pflanzlichen Geweben läßt sich die Protopektinhydrolyse durch verminderte Anfärbbarkeit, z. B. mit Rutheniumrot, nachweisen (z. B. Hauman, 1902; Carré und Horne, 1927).

Kolorimetrische Bestimmungen sind bisher nicht für quantitative Bestimmungen ausgearbeitet worden.

## 2.5. Aktivität

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der Kinetik des enzymatischen Pektinabbaus (Waksman und Allen, 1933; Ehrlich, 1937; Kertesz, 1939; Jansen und Macdonnell, 1945; Jansen, Macdonnell und Jang, 1945; Weber und Deuel, 1945; Deuel und Weber, 1945; Pallmann, Matus, Deuel und Weber, 1946; Weitnauer, 1946). Das Studium des Hydrolyseverlaufes hat jedoch bisher noch keine restlose Aufklärung des Reaktionsmechanismus gebracht. — Es hat sich gezeigt, daß die Geschwindigkeit der Pektolyse von zahlreichen Faktoren stark beeinflußt wird; neben *pH*, Temperatur und Konzentrationsverhältnissen sind verschiedenste Zusätze und vor allem die Art des verwendeten Substrates (Pektinpräparat) von großem Einfluß auf die Aktivität der Pektinase.

Für das *pH-Optimum* der Pektinase finden sich verschiedenste Angaben in der Literatur. Dies dürfte einerseits auf die Verwendung verschiedener Pektinasen, andererseits auf verschiedene Versuchsbedingungen (Temperatur, Ionenaktivität, Pektinpräparat usw.) zurückzuführen sein. Für Schimmelpilz-Pektinasen schwanken die Werte vorzugsweise zwischen *pH* 3 und 6, im Mittel dürfte das Optimum etwa bei *pH* 4 liegen. Einige Angaben der Literatur sind in folgender Übersicht zusammengestellt.

Nach Bestimmungen von Pallmann und Mitarbeitern (1946) scheint das *pH-Optimum* für Pektat etwas höher zu liegen als für hochveresterte Pektine. — Merkwürdig erscheint, daß nach Mehltz (1941) die Aktivität im *pH*-Bereich von 4 bis 7 konstant ist. Gewöhnlich erweisen sich Schimmelpilz-Pektinasen am Neutralpunkt als völlig inaktiv. Es ist zu vermuten, daß bei den Messungen von Mehltz gleichzeitig vorhandene Pektase eine für die Pektinase günstigere, saurere Reaktion geschaffen hat. Wenn man mit Pektinen und ohne Zusatz von Puffern arbeitet, läßt sich die den Abbau fördernde Wirkung

*pH-Optimum der Pektinase*<sup>1</sup>

Autor	Jahr	pH-Optimum
Davison und Willaman . . . . .	1927	3
Kertes z . . . . .	1930/36	3,0—3,5
Waksman und Allen . . . . .	1933	4
Mehlitz und Scheuer . . . . .	1934	4,5—6,3
Ehrlich, Guttman und Haensel . . . . .	1935	4 —6
Novotelnow und Barkovskaya . . . . .	1935	4,5
Popova . . . . .	1935	3,4—3,6
Matida und Tasiro . . . . .	1939	4,1—5,1
Proskurjakov und Ossipow	1939	4,5
Hajo . . . . .	1940	3,0—3,5
Mehlitz . . . . .	1941	4 —7
Weitnauer . . . . .	1946	3,5—5
Pallmann, Matus, Deuel und Weber . . . . .	1946	3,6—4,8
Phaff . . . . .	1947	3,7

der Pektase leicht beobachten. — Interessant ist, daß die Pektinasen (Protopektinasen?) verschiedener Mikroorganismen, die nicht auf sauren Früchten, wie z. B. *Botrytis cinerea* auf Äpfeln, sondern auf eher neutralen Geweben (Kartoffel) parasitieren, optimal bei pH 7 bis 8 arbeiten. Es wären hier Arten der Gattungen *Pseudomonas*, *Phytophthora* und *Pythium* zu nennen (Chona, 1932; Fernando, 1937; Oxford, 1944).

Ehrlich (1932) meint in einer älteren Arbeit, daß der Abbau durch Pektinase — er spricht von Pektolase — in Abhängigkeit vom pH in zwei Stufen erfolge; am Neutralpunkt soll nur eine geringe Hydrolyse eintreten und erst unterhalb pH 5 ein Abbau bis zur Galakturonsäure möglich sein. Bemerkenswert ist die Beobachtung Ehrlichs (1936), daß beim enzymatischen Abbau von Pektinsäure bei Abwesenheit von Puffer eine Abnahme des pH der Lösung erfolgt. Er führt dies auf die stärkere Dissoziation der monomeren Galakturonsäure zurück. Daß bei hochmolekularen Pektinen wegen der starken interionischen Kräfte die « Dissoziationskonstante » gegenüber der Galakturonsäure vermindert ist, wurde in der Literatur oft mitgeteilt (s. Zusammenfassung: Pallmann und Deuel, 1947). Eine systematische Untersuchung der Dissoziation von Pektinstoffen in Abhängigkeit von Poly-

<sup>1</sup> Es handelt sich in dieser Zusammenstellung fast ausschließlich um Pektinasen aus Schimmelpilzen.

merisationsgrad liegt jedoch bisher nicht vor. Oft ist die beobachtete pH-Abnahme auch auf eine enzymatische Verseifung zurückzuführen.

Die Angabe von *Temperatur-Optima* ist bedeutend problematischer als die von *pH-Optima*, da bei der Temperatur das Optimum durch irreversible Denaturierung des Enzyms zustande kommt. Das Temperatur-Optimum der Pektinase — wie wohl der meisten Enzyme — liegt um so tiefer, je länger die Reaktionsdauer ist (Weitnauer, 1946). Die meisten Angaben der Literatur liegen zwischen 30 und 40° C (Kertesz, 1930; Novotelnow und Barkowskaya, 1935; Popowa, 1935; Kertesz, 1936; Proskurjakow und Ossipow, 1939; Matida und Tasiro, 1939; Hajo, 1940; Weitnauer, 1946; Weber, Matus und Schubert, 1947), Kalliski und Mitarbeiter (1938) stellten ein Optimum bei 45°, Phaff (1943) bei 50° und Ehrlich (1937) bei 55° C fest; bei nur kurzer Einwirkung der Pektinase ist dies durchaus verständlich. Auf alle Fälle ist die Angabe eines Temperatur-Optimums ohne Angabe der Versuchsbedingungen von geringem Wert. — Die Hitzestabilität der Pektinase in Abwesenheit des Substrates wurde bisher nicht untersucht. — Die Pektinase erweist sich im allgemeinen als hitzelabiler als die Pektase und Amylase. Völlige Inaktivierung der Pektinase in wäßriger Lösung tritt nach kurzem Aufkochen, nach 15 Minuten bei 75° C (Bock, 1941), nach 20 Minuten bei 60° C (Davison und Willaman, 1927) oder nach 30 Minuten bei 55° C (Kertesz, 1930) ein. Aber auch diese Inaktivierungsbedingungen hängen sicher in starkem Maße von den übrigen Faktoren ab. — Trockenpräparate der Pektinase halten Erhitzung bedeutend besser aus. Genaue Angaben darüber fehlen jedoch.

Auch der Einfluß von *Zusätzen* auf die Aktivität der Pektinase ist noch nicht systematisch studiert worden. Sowohl Hemmungen als auch Aktivierungen sind beobachtet worden. So stellte Chona (1932) fest, daß die Pektinase bestimmter Mikroorganismen durch Kartoffelsaft gehemmt wird. Er führt dies auf Elektrolyte wie Magnesiumsalze zurück. Die Elektrolyte verursachten eine Verfestigung des pflanzlichen Gewebes, das jetzt den Pektinenzymen gegenüber resistenter geworden ist. Das Härten von Früchten wie Äpfel und Tomaten durch Kalksalze hat dann auch später Eingang in die Technik gefunden. Es kommt zur Bildung von Kalziumpektinaten und -pektaten. Loconti und Kertesz (1941) beobachteten, daß Kalziumpektat im Gegensatz zum Pektin nur sehr langsam von der Pektinase angegriffen wird. Auch die starke Hemmung der Pektinasewirkung durch Kalziumchlorid nach Manville, Reithel und Yamada (1939) kann auf eine Ausflockung des niederveresterten Pektins zurückgeführt werden. Nach Jansen, Macdonnell und Jang (1945) wird der Pektatabbau durch Magnesiumionen und auch durch Eiweiße wie kristallines

$\beta$ -Laktoglobulin gehemmt. Elektrolytunempfindlichere, höher veresterte Pektine dürften sich dem gleichen Elektrolyt gegenüber anders verhalten. — P a l l m a n n und Mitarbeiter (1946) studierten den Einfluß der Alkalichloride. Es trat stets eine deutliche Steigerung der Aktivität der Pektinase ein, die außerdem regelmäßig vom Lithium bis zum Caesium zunahm. — Da Pektinasepräparate stets geringe Mengen aktivierend wirkender Salze enthalten dürften, ist durch eine Reinigung wie Dialyse eine Abnahme der Aktivität zu erwarten. G r a ß m a n n und Mitarbeiter (1933) fanden auch eine solche Wirkung; es wäre jedoch auch möglich, daß durch die Reinigung eine schwache, irreversible Enzymdenaturierung stattgefunden hat.

M e h l i t z und M a a ß (1935) zeigten, daß durch einen Gehalt von 0,25 % Tannin in der Lösung der pektolytische Abbau auf die Hälfte vermindert wird. W e b e r, M a t u s und S c h u b e r t (1947) konnten eine solche Wirkung nicht feststellen. Vielleicht wurden verschiedene Gerbstoffe bei diesen beiden Untersuchungen verwendet. Daß Gerbstoffe auf Eiweiße denaturierend wirken können, ist lange bekannt. Unter gewissen Bedingungen kann jedoch auch eine Flockung zwischen Gerbstoffen und Pektinen eintreten. — Leicht läßt sich die enzymatische Pektolyse durch Zugabe von Formaldehyd abstoppen (M e h l i t z und M a a ß, 1935). — Nach O t t o und W i n k l e r (1942) soll es durch Einwirkung von Aminosäuren gelingen, die Pektinase zu inaktivieren. Durch Säure (F e r n a n d o, 1937; J a n s e n und M a c d o n n e l l, 1945) und noch leichter durch Lauge (D e u e l und W e b e r, 1945) läßt sich die Pektinase rasch zerstören. Die Pektinase von *Penicillium chrysogenum* wird bereits bei pH 7 bis 8 rasch inaktiviert (P h a f f, 1943); Bakterien-Pektinasen sind jedoch am Neutralpunkt sehr stabil, entsprechend ihrem höheren pH-Optimum. — Durch Konservierungsmittel wie Benzoe, Bor- und schweflige Säure wird das Enzym nicht gehemmt. Diese Zusätze können aber den Pektinabbau dadurch verhindern, indem sie das Wachstum pektinase-bildender Mikroorganismen (z. B. auf Apfeltrester) verunmöglichen.

Auch die Art des verwendeten Pektinpräparates beeinflusst die Aktivität der Pektinase. Bisher wurde nur der *Veresterungsgrad der Pektinsäure* systematisch variiert. Bereits eine Untersuchung von W a k s m a n und A l l e n (1933) zeigte, daß Pektinsäure rascher als Pektin von der Pektinase hydrolysiert wird. Auch M e h l i t z und M a a ß (1935) stellten eine gewisse Parallelität zwischen dem Pektinabbau und dem Verseifungsgrad fest. Als erste haben jedoch J a n s e n und M a c d o n n e l l (1945) klar ausgesprochen, daß ein Pektin um so langsamer von der Pektinase angegriffen wird, je höher es mit Methanol verestert ist. Völlig veresterte Pektinsäure wird nur ganz schwach hydrolytisch gespalten. Die beiden amerikanischen Forscher arbeiteten

mit pektasefreier Pektinase, und sie verfolgten die Hydrolyse vor allem durch Bestimmung der Aldehydgruppen nach der Methode von Willstätter und Schudel (1918). Bei gleichem Veresterungsgrad werden pektase-verseifte Pektine rascher und weitgehender durch Pektinase degradiert als alkali-verseifte Pektine. Es wird deshalb vermutet, daß nur solche glykosidischen Bindungen gespalten werden, die in ihrer Nachbarschaft zwei unveresterte Karboxylgruppen aufweisen. — Jansen und Macdonnell (1945) weisen noch darauf hin, daß im Laufe des Abbaus die Affinität des Enzyms zum Substrat stark absinkt. Vielleicht ist gebildete Digalakturonsäure dafür verantwortlich zu machen. — Nach Jansen, Macdonnell und Jang (1945) kann die Pektinase-Aktivität durch Zusatz von Pektase stark erhöht werden; dies ist verständlich, da die Pektase eine Vermehrung der freien Karboxylgruppen bewirkt. — Weber und Deuel (1945) und Pallmann und Mitarbeiter (1946) erhielten unabhängig von Jansen und Macdonnell ganz ähnliche Resultate. Sie bestimmten den Abbau der Makromoleküle durch genau standardisierte Viskositätsmessungen. — Auch für Glykolester der Pektinsäure gilt, daß die glykosidischen Bindungen um so langsamer gespalten werden, je höher der Veresterungsgrad ist (Deuel, 1947).

Bei der Ausarbeitung von *Methoden zur Bewertung von Pektinasepräparaten* oder bei der Aufstellung von *Pektinaseeinheiten* muß der Einfluß der verschiedenen Faktoren auf die Enzymaktivität berücksichtigt werden. Es finden sich hierfür Vorschläge in der Literatur (Waxman und Allen, 1933; Fernando, 1937; McCulloch und Kertesz, 1945; Weber und Deuel, 1945; Weitnauer, 1946; Weber, Matus und Schubert, 1947). Viskosimetrische Messungen dürften für praktische Zwecke durchaus brauchbar sein. Die Mehltz-Einheiten, die mit Hilfe der Kalziumpektat-Methode ermittelt werden, erscheinen ungeeignet (Mehltz und Maaß, 1935; Mehltz, 1941). Für wissenschaftliche Zwecke ist die Bestimmung der Zunahme an Aldehydgruppen nach Jansen und Macdonnell (1945) zu empfehlen.

## 2.6. Verwendung

Vor allem werden Pektinasepräparate bei der *Süßmostherstellung* verwendet. Das im Saft gelöste Pektin erhöht die Viskosität und verlangsamt daher eine Sedimentation der Trubstoffe. Schönung und Filtration sind durch das Pektin erschwert. Gleichzeitig und unabhängig voneinander entdeckten Kertesz (1930) in den Vereinigten Staaten und Mehltz (1930) in Deutschland die Brauchbarkeit der Pektinase zur Fruchtsaftherstellung. Im sauren Saft kann die zugesetzte Pektinase

das Pektin unter ziemlich optimalen Bedingungen zu niedermolekularen, nicht mehr mit Alkohol fällbaren Bruchstücken abbauen. Die Filtration wird durch den enzymatischen Pektinabbau erleichtert, die Klärung beschleunigt, und Nachtrübungen können verhindert werden. Schimmelpilzpektinasen werden als sog. *Filtrationsenzyme* in den Mostereien heute allgemein verwendet. In den Handelspräparaten finden sich neben der Pektinase als dem wichtigsten Wirkstoff noch verschiedene andere, teils erwünschte Enzyme (Amylase, Pektase) und Zusätze wie Kieselgur, Zucker, gemahlener Apfeltrester, Pilzmyzelien, Schönungsmittel usw. Zahlreiche technologische Arbeiten beschäftigen sich mit der Pektinase (z. B. Green und Kertesz, 1931; Willaman und Kertesz, 1931; Mehltitz, 1932, 1934, 1937, 1938, 1939; Fellers, Clague und France, 1933; Krumbholz, 1933; Willaman, 1933; Lange und Bohne, 1934; Widmer, 1934, 1937, 1941; Baker und Kneeland, 1935; Poore, 1935; Täufel, 1935; Charley und Mitarb., 1936, 1940, 1942, 1945; Fischer, 1937; Henkel, 1937; Kalliski und Mitarb., 1938; Svershkov, 1938; Zimmermann, Malsch und Weber, 1939; Tucker, 1941; Neubert, 1944; Neubert und Veldhuis, 1944; Schubert, 1946; Weitnauer, 1946; Weber, Matus und Schubert 1947).

Die Pektinase hat sich auch bei der Bereitung von *Traubensaft* und *Wein* bewährt (Green und Kertesz, 1931; Willaman und Kertesz, 1931; Widmer, 1939, 1941; Besone und Cruess, 1941; Cruess, 1943; Tauber, 1943; Weitnauer, 1946; Weber, Matus und Schubert, 1947). — Oft ist es zweckmäßig, die Pektinase dem *Fruchtbrei* vor der Pressung zuzusetzen. Das pflanzliche Gewebe wird durch die Enzymeinwirkung gelockert; dadurch ist die Pressung bedeutend erleichtert und häufig auch die Saftausbeute erhöht. Die Farbstoffe der Fruchtschale gehen auch leichter in den Saft über (Widmer, 1934, 1936; Maximenko, 1937; Hickenbotham und Williams, 1940; Crang und Croxall, 1944). Auch z. B. aus Zwiebeln können mit Hilfe von Pektinase Extrakte vereinfacht gewonnen werden (Cruess, 1944). — Von großer praktischer Bedeutung ist die Pektinase auch bei der Fabrikation von *Fruchtsaftkonzentraten*, da der fermentative Pektinabbau eine Geliderung im Konzentrator verhindert. — Die Verwendung von Pektinase ist allgemein in der Lebensmittelindustrie gestattet, es tritt auch keine Geschmacksveränderung wie bei der Benützung chemischer Mittel zum Pektinabbau ein.

Zur *Pektinentfernung von Fasern* ist die Pektinase empfohlen worden (Henk, 1941; Bonnet, 1943). Zur Faserröste sind jedoch bisher Pektinasepräparate nicht herangezogen worden. — Nach Peschke und Tobler (1925) kann mit Hilfe von Bakterien, die Pektinenzyme bilden, aus Kartoffeln eine höhere Ausbeute an Stärke und eine bessere

Stärkequalität erzielt werden (s. auch Thaysen und Bunker, 1927). — Für die schaumfreie Vergärung von Zuckerrübenmaishe soll u. a. Pektinase günstig wirken (Strothmann, 1938).

In manchen *Verdauungspräparaten* (z. B. dem Luizym der Luitpoldwerke, München) findet sich Pektinase als einer der wirksamen Bestandteile. Durch das Enzym soll ein Aufschluß der pflanzlichen Kost bei Verdauungsschwächen gewährleistet werden.

Für die Gewinnung von *Galakturonsäure* hat sich der fermentative Abbau von Pektinstoffen als sehr brauchbar erwiesen. Die Ausbeute kann mehr als 90 % der Theorie betragen und ist bedeutend höher als bei der Hydrolyse mit Mineralsäuren (Ehrlich, Guttman und Haensel, 1935; Ehrlich, 1936; Mottern, 1939; Mottern und Cole, 1939; Manville, Reithel und Yamada, 1939; Pigman 1940). Rietz und Maclay (1943) verwenden an Stelle von Pektinsäure Pektin. Im Enzympräparat muß dann sicher für eine befriedigende Ausbeute noch Pektase vorhanden sein. Isbell und Frush (1944) und Frush und Isbell (1944) lassen das Enzym direkt auf das pektinhaltige Pflanzenmaterial (Zitrusalbedo, Zuckerrübenschnitzel) einwirken. — Galakturonsäure kann z. B. als Ausgangsprodukt für die Gewinnung von Altronsäure und Ascorbinsäure dienen (Isbell, 1944; Regna und Caldwell, 1944).

Die Pektinase läßt sich auch für verschiedene *analytische Zwecke* verwenden. Nach Widmer (1934) erleichtert dieses Enzym z. B. die Filtration bei der Weinsäurebestimmung in Früchten. — Letzig (1936 und 1942) benützt Pektinase zum qualitativen Pektinnachweis in Milchprodukten. Bei Viskositätsabnahme nach Fermenteinwirkung schließt er auf Pektin. Dabei ist natürlich die Freiheit des Enzympräparates von unerwünschten anderen Fermenten sehr wichtig. — Auch zur quantitativen Pektinanalyse ließe sich die Pektinase brauchen; man müßte die reduzierenden Gruppen vor und nach vollständigem Pektinabbau bestimmen. — Colin und Lemoyne (1936) versuchten eine Pektinextraktion aus Rübenschnitzeln auf enzymatischem Wege. — Nach Isbell und Frush (1944) dürfte bei der Analyse von Lebens- und Futtermitteln die Bestimmung des durch Pektinase löslichen Anteils ein gewisses Interesse beanspruchen. — Loconti und Kertes (1941) zeigten, daß Kalziumpektat durch seine Pektinaseresistenz von Pektin und Pektinsäure unterschieden werden kann. — Die mikroskopische Beobachtung mancher pflanzlicher Gewebe kann durch Vorbehandlung mit Pektinase erleichtert werden, z. B. bei Chromosomen-Untersuchungen (Stuart und Emsweller, 1943; Fabergé, 1945).

Es sei zum Schluß noch erwähnt, daß es auch Fälle gibt, wo vorhandene Pektinase als schädlich zu bezeichnen ist, z. B. bei der Lagerung

von Apfeltrester für die Pektingewinnung, in Konserven verschiedener pflanzlicher Produkte oder in Amylase-Präparaten für die Klärung von Pektinsäften.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Pektinstoffe

Die verwendeten *Pektine*<sup>1</sup> waren gründlich mit Salzsäure-Alkohol gereinigte Präparate. Sie enthielten zirka 80 % Reinpektin und 8 % Wasser. Teilweise wurden für die enzymatischen Versuche direkt diese Pektinpräparate verwendet. Die Charakterisierung der benutzten Pektine, die in den Tabellen des experimentellen Teiles stets angeführt sind, erfolgte nach den im Agrikultur-chemischen Institut der ETH üblichen Methoden. Die Analysenverfahren wurden bereits öfters eingehend veröffentlicht (s. Zusammenfassung bei P a l l m a n n und D e u e l, 1947).

Einige Untersuchungen wurden mit *Natriumpektat*, das frei von Methylestergruppen ist, angestellt. Dieses Präparat wurde durch heterogene Verseifung mit einem Überschuß an alkoholischer Natronlauge und durch anschließendes Waschen auf der Nutsche mit verdünntem Alkohol, Alkohol und Äther gewonnen. Zur Gewinnung von Pektaten verschiedenen Polymerisationsgrades wurden wäßrige Lösungen mit dem Enzym Pektinase behandelt. Nach verschiedenen Einwirkungszeiten wurde der Pektatabbau durch Aufkochen der Lösungen unterbrochen. Die verschiedenen Degradationsprodukte sind im experimentellen Teil durch Viskosität und Aldehydendgruppen charakterisiert.

Eingehend sollte vor allem der Einfluß des Veresterungsgrades des Pektinstoffes auf die Geschwindigkeit der fermentativen Hydrolyse studiert werden. Für diese Untersuchungen wurden *Glykolester der Pektinsäure* verwendet (D e u e l, 1947). Diese Derivate der Polygalakturonsäure besitzen für die vorliegenden Versuche die folgenden Vorteile gegenüber den natürlichen Methylestern:

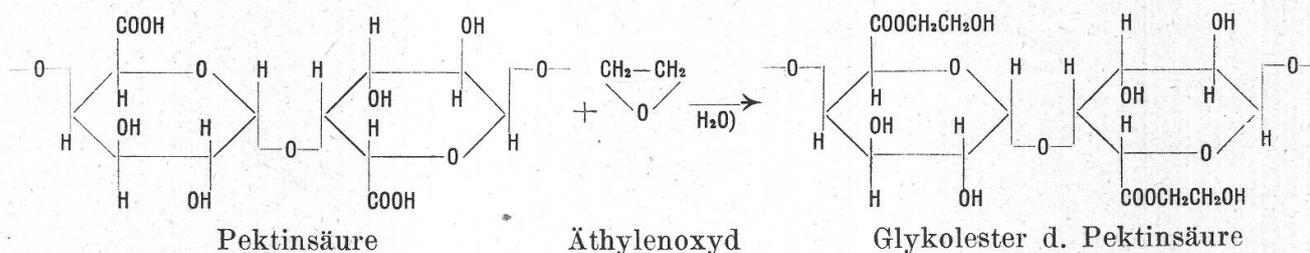
1. Leicht können aus Pektinsäuren durch Einwirkung von Äthylenoxyd und Wasser Glykolester jeden beliebigen Veresterungsgrades zwischen 0 und 100 % hergestellt werden.
2. Die Glykolester besitzen bei geeigneter Herstellungsmethode — verglichen mit der Ausgangs-Pektinsäure — kaum verminderte Polymerisationsgrade.
3. Die Glykolester werden durch das Enzym Pektase nicht wie der Methylester verseift. Selbst bei sehr langer Einwirkungszeit konnte mit verschiedenen Pektasepräparaten aus Tomate, Luzerne, Carica Papaya, *Botrytis cinerea* keine Verseifung beobachtet werden.

---

<sup>1</sup> Die Präparate wurden von der Unipektin AG., Zürich, in verdankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Die Pektinasepräparate des Handels (auch die in der vorliegenden Arbeit benutzten) enthalten fast immer auch Pektase. Die Kinetik des Pektinabbaues durch Pektinase kann jedoch durch vorhandene Pektase, wenn diese Pektin verseift, sehr stark verändert werden. Meist läßt sich durch die gleichzeitig stattfindende Verseifung eine deutliche Beschleunigung des Abbaues feststellen. Dies ist einerseits auf die Schaffung eines für die Pektinase günstigeren, saureren Milieus zurückzuführen und andererseits darauf, daß niederveresterte Polygalakturonsäure rascher und weitgehender durch die Pektinase hydrolysiert wird (s. Abschnitt 2,5). Wiederholt wurde deshalb versucht, die Pektase in Pektinasepräparaten durch Säurebehandlung oder Perkolation der Enzymlösungen durch Kationenaustauscher zu inaktivieren (Jansen und Macdonnell, 1945; McCulloch und Kertesz, 1945). Eine solche Inaktivierung der Pektase ist jedoch recht schwierig und ist stets mit einer starken Abnahme der Aktivität der Pektinase verbunden. Eine Entfernung der Pektase ist bei Versuchen mit Glykolestern der Pektinsäure unnötig.

Für die Darstellung des Glykolesters der Pektinsäure gilt folgende Reaktionsgleichung:



Die Glykolester wurden durch heterogene Veresterung aus Pektinsäure, die als feines Pulver in der Äthylenoxyd-Wasser-Mischung suspendiert war, hergestellt. 50 g Pektinsäure wurden in zirka 500 cm<sup>3</sup> Äthylenoxyd, das vorher mit 50 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt worden war, gegeben. Die Reaktionsmischung wurde in einer gut verschlossenen Flasche bei 15° C während vier bis zehn Tagen aufbewahrt. Danach war die Pektinsäure völlig verestert. Das Äthylenoxyd wurde dann auf der Nutsche abgesaugt und der Pektinsäure-Glykolester noch gründlich mit verdünntem Alkohol, Alkohol und Äther vor der Trocknung bei 40° C gewaschen. Dieses Präparat wurde für die Versuche der Tabelle 20 verwendet.

Für die übrigen Bestimmungen an Glykolestern der Pektinsäure wurde die Veresterung in Gegenwart größerer Mengen Wasser vorgenommen. 120 g Pektinsäure wurden auf der Nutsche — vor allem zur Entfernung der alkalischen Aschen — mit 50prozentigem Alkohol, der pro Liter 100 cm<sup>3</sup> konzentrierte Salzsäure enthielt, während drei Stunden gewaschen. Nachher wurde zur Säureentfernung die Pektinsäure weiter mit 50prozentigem Alkohol, Alkohol und Äther gewaschen. Die

gereinigte Pektinsäure wurde in eine 2-Liter-Flasche gegeben und mit 900 cm<sup>3</sup> Wasser und 300 cm<sup>3</sup> Äthylenoxyd übergossen. Darauf wurde die Flasche gut verschlossen und auf einer Rollmaschine bei Zimmertemperatur langsam gedreht. Bereits nach wenigen Stunden war durch partielle Veresterung eine homogene, viskose Lösung entstanden. Nach 13 Tagen war völlige Veresterung eingetreten; die wäßrige Lösung war gegenüber Bromthymolblau neutral. Der Ester konnte durch CaCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub> oder CuSO<sub>4</sub> nicht mehr ausgeflockt werden. Zur Fällung des Esters wurde die klar filtrierte Lösung unter ständigem Umrühren mit 3 Liter Azeton versetzt. Der Niederschlag wurde dann mit einem Koliertuch abfiltriert und abgepreßt und mit Azeton und Äther auf der Nutsche gründlich gewaschen. Darauf wurde im Trockenschrank bei 40° C getrocknet und das faserige Material in der Kugelmühle gemahlen. Es wurden etwas über 100 g trockener Glykolester erhalten. Eine Charakterisierung dieses Präparates findet sich in der folgenden Tabelle 1.

Tabelle 1  
Charakterisierung eines Glykolesters der Pektinsäure

(Annähernd zu 100 % verestert)	
Wasser . . . . .	10,8 %
Asche . . . . .	1,1 %
Polygalakturonsäure-Glykolester <sup>1</sup> . . . . .	77,1 %
Natriumpektat-Viskosität <sup>2</sup> . . . . .	0,253

Zur Herstellung von Glykolestern verschiedenen Veresterungsgrades aber möglichst gleichen Polymerisationsgrades, wurde stets der 100-prozentige Glykolester verwendet. Zur Erzielung einer bestimmten Verseifung wurde einfach zur wäßrigen Lösung des 100-prozentigen Glykolesters eine entsprechende Menge Natronlauge zugefügt. Nach Stehenlassen der Lösung während zwei Tagen bei Zimmertemperatur war praktisch die gesamte Natronlauge zur Verseifung verbraucht worden. Diese Lösungen mit Glykolestern des gewünschten Veresterungsgrades wurden dann direkt weiter für die enzymatischen Versuche verwendet. Es wurde

<sup>1</sup> Die titrimetrische Bestimmung der veresterten Karboxyle durch Verseifung des Esters mit Natronlauge im Überschuß ergab 0,350 Äquivalente pro 100 g Präparat. Der genau gleiche Wert wurde bei der Bestimmung des durch Verseifung abgespaltenen Glykols nach der Perjodatmethode (Hoepe und Treadwell, 1942) erhalten. Daraus wurde der Gehalt an Polygalakturonsäure-Glykolester mit Hilfe des theoretischen Äquivalentgewichtes von 220,18 berechnet. — Die Dekarboxylierung des Präparates mit 12 % Salzsäure bei zirka 140° C nach Tollens-Lefèvre (s. Weber, 1944) lieferte ebenfalls 0,35 Äquivalente Urönsäure pro 100 g Präparat.

<sup>2</sup> Die Bestimmung wurde genau nach dem bei Deuel und Weber (1945) angegebenen Verfahren in 0,05 n NaOH ausgeführt.

wiederholt viskosimetrisch und durch Endgruppenbestimmungen nachgewiesen, daß bei der alkalischen Verseifung kein Molekülabbau eintritt.

### 3,2. Pektinase

Für die Untersuchungen wurden verschiedene Pektinasepräparate<sup>1</sup> bedeutender Aktivität verwendet. Meist wurde keine Reinigung dieser Präparate vorgenommen; nur für einige Bestimmungen wurden dialysierte und elektrodialysierte Enzymlösungen gewonnen. Die schneeweißen Präparate waren aus einem uns nicht bekannten Schimmelpilz gewonnen worden; sie enthielten jedoch keine Mycelien mehr. Im experimentellen Teil werden die drei verwendeten Pektinasepräparate mit I, II und III bezeichnet. In dieser Reihenfolge nimmt die Aktivität zu.

Wie bei der Besprechung der Literatur erwähnt wurde, finden sich im Schrifttum verschiedene Methoden zur Bestimmung von « Pektinase-Aktivitäten ». Dabei wurde jedoch meist nicht beachtet, daß zum Beispiel im Enzympräparat vorhandene Pektase oder die Art des verwendeten Pektins die Aktivität stark beeinflussen kann. Ein brauchbarer Aktivitätstest kann erst dann ausgearbeitet werden, wenn man bereits weitgehend über den Einfluß der verschiedenen Faktoren auf die Wirksamkeit der Pektinase orientiert ist. Ein Ziel der vorliegenden Untersuchungen war gerade, Unterlagen dafür zu schaffen. Zur ungefähren Bewertung der verwendeten Pektinaseproben sollen jedoch die « Pektinase-Einheiten », die sich in der Praxis zur Beurteilung der Muster als Filtrationsenzyme bewährt haben, angegeben werden<sup>2</sup>:

Pektinase I	mit	500	« Pektinase-Einheiten »	pro	g
Pektinase II	»	1 100	»	»	»
Pektinase III	»	13 000	»	»	»

Die verwendete Aktivitätsbestimmung ist der Verwendung der Pektinase als Filtrationsenzym bei der Süßmostgewinnung angepaßt. Die Methodik ist von Weber, Matus und Schubert (1947) beschrieben worden. Man ermittelt unter Standardbedingungen den Pektinabbau in verdünntem Apfelkonzentrat. Maßgebend ist die Enzymmenge, die nötig ist, um die spezifische Viskosität um 60 % zu vermindern.

### 3,3. Viskosität

Zur Verfolgung des enzymatischen Pektinabbaus ist die Bestimmung der Viskositätsabnahme der wäßrigen Pektatlösungen recht brauchbar. Die Methodik ist sehr einfach und wurde bereits in verschie-

<sup>1</sup> Der Schweiz. Ferment AG., Basel, danke ich bestens für die Überlassung der Präparate.

<sup>2</sup> Diese Angaben verdanke ich Herrn Dr. F. Weber, Unipektin AG., Zürich.

denen Arbeiten des Agrikultur-chemischen Institutes der ETH verwendet (Deuel, 1943; Weber, 1944; Deuel und Weber, 1945; Weber und Deuel, 1945; Pallman, Matus, Deuel und Weber, 1946; Pilnik, 1946).

Für Vergleichszwecke müssen die Viskositäten stets unter den gleichen Bedingungen gemessen werden, wenn die Viskositätsbestimmungen, die von den verschiedensten Faktoren stark beeinflußt werden, direkt als relatives Maß für den Polymerisationsgrad (und eventuell die Polydispersität) betrachtet werden sollen.

Bei den Untersuchungen des experimentellen Teiles ist zu unterscheiden zwischen den Bedingungen, denen die Pektinase vor der Einwirkung auf das Substrat ausgesetzt ist, den Bedingungen, die während des enzymatischen Abbaus herrschen, und den Konzentrations- und Temperaturverhältnissen, die nach Inaktivierung der Pektinase zur Messung der Viskosität eingestellt werden.

*Bedingungen beim enzymatischen Abbau:* Für das Studium des enzymatischen Pektinabbaus darf innerhalb einer Versuchsserie nur ein Faktor oder nur wenige Faktoren von Lösung zu Lösung verschieden sein (z. B. nur Änderung des pH bei Konstanz von Enzymkonzentration, Pufferkonzentration, Pektinkonzentration, Veresterungsgrad des Pektins, Temperatur, Versuchsdauer usw.).

*Zusammensetzung der Lösungen, die nach Enzym-Inaktivierung zur Viskositätsmessung verwendet werden:* Waren die Lösungen einer Versuchsserie während der Enzymeinwirkung verschieden zusammengesetzt, so muß nun dafür gesorgt werden, daß diese Unterschiede völlig ausgeglichen werden, denn nur bei genau gleich zusammengesetzten Lösungen kann die Viskosität als Maß für die Kettenlänge der Makromoleküle (Mittelwerte) dienen. Wurde zum Beispiel der Einfluß der Kochsalzkonzentration auf die Pektinaseaktivität untersucht, so muß jetzt dafür gesorgt werden, daß alle Lösungen gleich viel Kochsalz enthalten. Wurde bei einer anderen Versuchsserie der Einfluß des Veresterungsgrades der Pektinsäure geprüft, so wird die Viskosität erst nach Verseifung aller Lösungen bis zum Pektat gemessen. Zur Vereinheitlichung der Viskositätsmessungen wurde bei allen Versuchen die Viskosität an den völlig verseiften Natriumpektaten bestimmt. Dazu werden die Lösungen mit einem Überschuß an Natronlauge versetzt und einige Zeit bis zur totalen Verseifung stehengelassen. Dadurch wird also zunächst der verschiedene Veresterungsgrad (mit Methanol oder Glykol) während der Aktivitätsbestimmung ausgeschaltet. Außerdem gestattet die Zugabe der Natronlauge im Überschuß, die Enzymreaktion zu jeder gewünschten Zeit zu unterbrechen. Es tritt sofortiges Abstoppen der fermentativen Hydrolyse ein; das Enzym wird dann auch sehr rasch irreversibel inaktiviert. Zugleich dient jedoch der Überschuß an Natronlauge zur Ausschaltung des elektro-viskosen Effektes, der die Viskosität stark

beeinflussen kann. Wiederholt wurde nachgewiesen, daß die alkalischen Natriumpektat-Lösungen während langer Zeit stabil sind und keine Abnahme der Viskosität zeigen. Die Viskositätsmessungen wurden stets in 0,05 n NaOH ausgeführt.

Es ist wichtig, zu betonen, daß die Bestimmungen der Viskosität stets in den gleichen Viskosimetern vorgenommen werden müssen. Es sind hier sehr deutliche Abweichungen vom Hagen-Poiseuilleschen Gesetz zu beobachten. Die Viskositäten wurden in der vorliegenden Arbeit stets nach Filtration der Natriumpektatlösungen im Höppler-Präzisionsviskosimeter bei 20,0° C bestimmt.

Zur Charakterisierung der Viskosität der Lösungen wird die *Zähigkeitszahl* Z gewählt. Z ist als Quotient der spezifischen Viskosität  $\eta_{sp}$  und der Milliäquivalente m an Natriumpektat pro 100 cm<sup>3</sup> Lösung definiert.

$$Z = \frac{\eta_{sp}}{m}$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{t - t_0}{t_0}$$

$\eta$  = Viskosität der Natriumpektat-Lösung; sie ist proportional der Fallzeit t der Kugel im Höppler-Viskosimeter.

$\eta_0$  = Viskosität des Lösungsmittels (0,05 n NaOH ev. mit verschiedenen Zusätzen); sie ist proportional der Fallzeit  $t_0$  der Kugel.

Die Zähigkeitszahl Z gilt stets nur für die Natriumpektat-Konzentration m der jeweiligen Lösung. Eine Extrapolation für die Konzentration  $m = 0$  (« intrinsic viscosity ») wird nicht vorgenommen. m liegt für die meisten Versuche zwischen 0,5 und 1,5 Milliäquivalente Natriumpektat pro 100 cm<sup>3</sup> Lösung. Als  $Z_0$  wird die Zähigkeitszahl der noch nicht durch Pektinase abgebauten Lösung (am Anfang des Versuches) bezeichnet. Z ist die Zähigkeitszahl der abgebauten Lösung. In den Tabellen des experimentellen Teiles wird Z in Prozenten von  $Z_0$  angegeben. Beträgt zum Beispiel Z in Prozenten von  $Z_0$  50 %, so bedeutet dies natürlich nicht, daß der enzymatische Abbau bis zu 50 % erfolgt ist. Schon durch die Hydrolyse eines sehr geringen Prozentsatzes der glykosidischen Bindungen kann die Viskosität auf die Hälfte sinken. Viskositätsmessungen eignen sich besonders zur Verfolgung der ersten Stadien der fermentativen Pektinhydrolyse.

*Beispiel:* Es soll im folgenden an einer Versuchsserie die Methodik zur Bestimmung des enzymatischen Pektinabbaus mit Hilfe viskosimetrischer Messungen beschrieben werden. Gleichzeitig soll dieses Beispiel die Reproduzierbarkeit der Methode zeigen.

*Einfluß des Veresterungsgrades von Pektinsäure  
auf die Pektinase-Aktivität*

*a) Herstellung von Lösungen der Pektinate verschiedenen Veresterungsgrades*

In 100-cm<sup>3</sup>-Meßkölbchen wurden je 10 cm<sup>3</sup> wäßrige Lösung mit 1,44 Milliäquivalenten Pektinsäure-Glykolester (völlig verestert) gegeben. Dazu wurden verschiedene Mengen Natronlauge (0, bzw. 0,36, bzw. 0,72, bzw. 1,08, bzw. 1,44 Milliäquivalente NaOH) zugesetzt, um Veresterungsgrade von 100, 75, 50, 25 und 0 % zu erhalten. Nach Stehenlassen bei Zimmertemperatur während zwei Tagen war die Verseifung in gewünschtem Umfang eingetreten. Jetzt wurden der Natronlauge äquivalente Mengen an Salzsäure zugefügt und außerdem noch Natriumchlorid, so daß alle Lösungen 1,44 Milliäquivalente Natriumchlorid enthielten. Es wurde nun noch Wasser zugefügt, so daß sich in jedem Kölbchen 20 cm<sup>3</sup> Lösung befanden. Außerdem gab man zu jedem Kölbchen 15 cm<sup>3</sup> verdünnten Zitratpuffer von pH 3,9 (Mischung aus gleicher Volumina m/10 Dinatriumzitat und n/10 HCl).

*b) Enzymatischer Abbau der Pektinstoffe*

Die Kölbchen mit den Lösungen wurden auf 30° C gebracht, je mit 1 cm<sup>3</sup> einprozentiger Pektinaselösung (Pektinase II) versetzt und mit Wasser von 30° C auf 50 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Man ließ das Enzym genau 30 Minuten bei 30° C einwirken und stoppte die Reaktion durch Zugabe von 25 cm<sup>3</sup> 0,25 n NaOH ab.

*c) Viskositätsmessungen*

Die Lösungen wurden 24 Stunden zur völligen Verseifung des Glykolesters bei Zimmertemperatur stengelassen. Darauf wurden die Meßkölbchen mit destilliertem Wasser auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Nach Filtration der Lösungen durch Glasfilter wurden nun die Viskositäten im Höppler-Viskosimeter bei 20,0° C gemessen. Bei allen Versuchen wurden stets auch die Viskositäten am Anfang (ohne Enzymeinwirkung) bestimmt. In der folgenden Tabelle 2 ist die Berechnung der Zähigkeitszahl für einen Versuch der Serie, bei dem der Veresterungsgrad der Pektinsäure 25 % betrug, wiedergegeben.

Tabelle 2

*Beispiel für die Berechnung der Zähigkeitszahl*

Enzymatischer Abbau einer Pektinsäure, die zu 25 % mit Glykol verestert war. Fallzeit der Kugel im Höppler-Viskosimeter für die alkalische Lösung ohne Pektat:  $t_0 = 89,6$  Sekunden.

Versuch mit	Fallzeit in Sekunden	$\eta_{sp}$	$Z = \eta_{sp}/1,44$	Z in % von $Z_0$
inaktiviertem Enzym	122,4	0,365	0,253 ( $Z_0$ )	100
aktivem Enzym	104,8	0,170	0,118	46,7

Die Versuchsergebnisse für alle fünf Veresterungsgrade sind in der folgenden Tabelle 3 zusammengestellt. Die Versuchsserie wurde viermal an verschiedenen Tagen wiederholt. (Im experimentellen Teil werden die Resultate aller Versuche stets nur in Form dieser Tabelle wiedergegeben.)

Tabelle 3

*Beispiel für die viskosimetrische Bestimmung des enzymatischen Pektinabbaus.  
Einfluß des Veresterungsgrades auf die Aktivität der Pektinase*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure:  
1,44 Milliäquivalente

$Z_0 = 0,253$

Pektinase II: 10 mg

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 50 cm<sup>3</sup>

Temperatur: 30° C

Reaktionsdauer: 30 Minuten

**Variabel:**

Veresterung der Polygalakturonsäure mit  
Glykol: 100, 75, 50, 25 und 0 %.

Veresterungsgrad der Polygalakturonsäure %	Wiederholung Nr.			
	I	II	III	IV
	Z in % von $Z_0$			
100	100	100	100	100
75	68,4	68,4	67,6	67,6
50	53,4	53,4	53,0	53,1
25	46,7	46,7	46,6	46,5
0	52,2	52,2	51,8	51,8

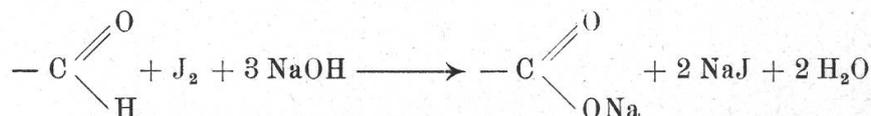
Von Interesse ist bei den Messungen der Tabelle 3 vor allem, daß die Reproduzierbarkeit der Methodik sehr befriedigend ist. Der Versuch zeigt außerdem, daß unter den Versuchsbedingungen der 100prozentige Glykolester von der Pektinase nicht angegriffen wird. Merkwürdigerweise erfolgt der rascheste Abbau nicht bei einem Veresterungsgrad von 0 %, sondern von 25 %.

### 3.4. Aldehyd-Endgruppen

Neben der Verminderung der Viskosität wurde noch die Zunahme der Aldehydgruppen für das Studium des enzymatischen Abbaus herangezogen. In zahlreichen Arbeiten hat man sich dieser Methodik in der Pektinchemie bedient (Weber, 1944; Deuel und Weber, 1945). Bereits die Ausgangspektinstoffe besitzen reduzierende Gruppen. Die Menge der Aldehydgruppen ist hier sehr variabel und scheint nicht immer mit dem Molekulargewicht symbar zu verlaufen. Daher ist in der vorliegenden Arbeit stets nur die Zunahme an Aldehydgruppen durch Enzymeinwirkung von Interesse. Im Gegensatz zu den Viskositätsmessungen eignen sich die Endgruppenbestimmungen auch noch für stark abgebaute Pektinpräparate. Für kinetische Untersuchungen ist die

Aldehydbestimmung vorzuziehen, da sie ein direktes Maß für den Umfang der Reaktion ergibt. Bei der Aufstellung von Pektinaseeinheiten wird man sich auch mit Vorteil dieser Methode bedienen (J a n s e n und M a c d o n n e l l, 1945).

Die Aldehydgruppen werden in dieser Arbeit durch Oxydation mit alkalischer Hypojoditlösung nach Willstätter und Schudel (1918) bestimmt. Die Analyse beruht auf folgender, stöchiometrisch verlaufender, Reaktion:



Der Jodüberschuß wird dann mit Natriumthiosulfat in bekannter Weise zurücktitriert. Wichtig zur Erzielung einwandfreier, reproduzierbarer Resultate ist die Einhaltung der genauen Arbeitsvorschriften, da sonst Nebenreaktionen, wie die Bildung von Natriumjodat, auftreten.

Die schwach schwefelsaure Lösung wird mit dem doppelten Überschuß 0,1 n Jodlösung versetzt. Darauf läßt man unter gutem Umrühren während zirka 2 Minuten die 1,5fache Menge 0,1-n-NaOH-Lösung (bezogen auf Jodlösung) langsam zutropfen. Die alkalische Lösung wird nun genau 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und in Gegenwart von Stärke mit Natriumthiosulfat titriert.

Für die Aldehydbestimmungen werden die gleichen Lösungen wie für die Viskositätsmessungen verwendet, denn gerade die Beziehung zwischen Abnahme der Viskosität und Zunahme der Aldehydgruppen beansprucht Interesse. Die Lösungen sind also anfangs alkalisch, da ja durch Zugabe von Natronlauge die Enzymreaktion unterbrochen worden war. Es ist natürlich wichtig, daß bei der alkalischen Vorbehandlung keine Vermehrung der Aldehydgruppen eintritt. Die Messungen der Tabelle 4 zeigen, daß Vorsicht nötig ist; denn Natriumpektat, das in 0,05 n NaOH gelöst ist, zeigt mit der Zeit eine deutliche Zunahme an Aldehydgruppen.

Tabelle 4

*Einfluß von 0,05 n Natronlauge auf die reduzierenden Gruppen von Natriumpektat*

Je Versuch: 1,48 Milliäquivalente Natriumpektat

2,50 Milliäquivalente Natronlauge

50 cm<sup>3</sup> Gesamtvolumen

Temperatur: 20° C.

Variiert wurde die Einwirkungsdauer der Natronlauge.

Einwirkungsdauer in Tagen	1/6	1	3	6	10	15	20
Aldehyd % <sup>1</sup> . . . . .	1,2	8,8	16,1	24,9	33,8	42,2	50,5

<sup>1</sup> Erklärung im Text.

Läßt man die verdünnte Natronlauge jedoch nur eine Stunde auf das Pektat einwirken, so ist eine kaum meßbare Zunahme an Aldehydgruppen festzustellen. Von Interesse ist, daß unter den Bedingungen der Tabelle 4 trotz deutlichen Anstiegs der reduzierenden Substanzen keine Abnahme der Viskosität eintritt. Bei den Aldehydbestimmungen im experimentellen Teil werden die Messungen stets eine Stunde nach Unterbrechung der Reaktion mit Alkali ausgeführt. Danach ist auch die Pektinase irreversibel zerstört worden. Die Lösungen werden mit Schwefelsäure schwach angesäuert und dann wird genau wie oben angegeben nach Willstätter und Schudel verfahren.

Von den erhaltenen Milliäquivalenten Aldehyd des enzymatisch abgebauten Pektinpräparates werden stets die Milliäquivalente Aldehyd des unabgebauten Präparates abgezogen. Diese Differenz ist also auf die Enzymwirkung zurückzuführen; sie wird im folgenden stets in Prozent der Milliäquivalente Gesamt-Uronsäure ausgedrückt und kurz als *Aldehydprozent* bezeichnet. Diese Prozentzahl ist ein Maß für den Umfang der hydrolytischen Pektindegredation. Einwandfreier wäre noch die Berechnung der Zunahme an Aldehydgruppen in Prozenten der Gesamt-Aldehydgruppen, die nach vollständiger Hydrolyse bis zu monomerer Galakturonsäure frei werden.

## 4. Untersuchungsergebnisse

### 4.1. Stabilität der Pektinase

Vor allem galt es, den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Aktivität der Pektinase zu studieren. Dazu werden allgemein in der Enzymologie die Geschwindigkeiten der durch das betreffende Enzym katalysierten Reaktion unter verschiedensten Bedingungen gemessen, zum Beispiel bei verschiedenen Temperaturen oder verschiedenen Wasserstoffionen-Aktivitäten. Diese Bestimmungen zeigen jedoch nicht ohne weiteres, ob es sich in einem bestimmten Fall um eine reversible Aktivitätsverminderung oder um eine irreversible Enzymzerstörung (Denaturierung) handelt. Darüber können einfache *Stabilitätsuntersuchungen* Auskunft geben. Hierbei wird das Enzympräparat in trockenem Zustand oder als Lösung zunächst ohne Substrat während einer gewissen Zeit einem bestimmten äußeren Milieu ausgesetzt. Erst daran anschließend wird dann die Aktivität des behandelten und unbehandelten Enzympräparates unter genau gleichen Bedingungen ermittelt. Für diese Aktivitätsbestimmungen wählt man möglichst Bedingungen, die für das betreffende Enzym optimal sind. Beim Aktivitätstest soll möglichst keine irreversible Enzymzerstörung mehr stattfinden; d. h. man wird relativ kurze Reaktionszeiten und nicht zu hohe Temperaturen wählen. Zeigt nun das behandelte Präparat eine geringere Aktivität als das unbehan-

delte, so dürfte meist ein irreversibler Prozeß stattgefunden haben. In vielen Fällen handelt es sich bei diesen irreversiblen Vorgängen um Zeitreaktionen.

Das Studium der Stabilität der Pektinase ist zum Beispiel bei der Kultivierung der das Enzym bildenden Mikroorganismen und bei der Extraktion des Enzyms aus dem Rohmaterial von Interesse. Auch bei der Inaktivierung störender Enzyme, die im Pektinasepräparat eventuell vorhanden sind, muß die Stabilität der Pektinase bekannt sein. Für die später folgenden Aktivitätsbestimmungen an Pektinase war vor allem wichtig, über den Einfluß erhöhter Temperatur und von Natronlaugezusätzen auf die Stabilität Bescheid zu wissen.

Bei den Versuchen der Tabelle 5 wurde das *Pektinasepräparat in lufttrockenem Zustand verschiedenen Temperaturen* ausgesetzt.

Tabelle 5

*Einfluß der Temperatur auf die Stabilität von lufttrockenem Pektinasepräparat*

**Konstant:**

Behandlungsdauer der Pektinase (vor der Aktivitätsbestimmung): 3 Stunden.

Natriumpektat (Veresterungsgrad 0 %): 0,560 Milliäquivalente

$Z_0 = 0,598$

Pektinase I: 10 mg

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 60 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 20° C

Reaktionsdauer: 3 Stunden.

**Variabel:**

Temperatur bei der Behandlung der Pektinase (vor der Aktivitätsbestimmung): 20 bis 100° C.

Temperatur	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Z in % von $Z_0$	67,2	67,2	67,2	67,2	67,2	67,2	69,6	77,0	95,0

Das lufttrockene Enzympräparat erwies sich als recht hitzestabil, erst bei 80° C trat eine schwache irreversible Inaktivierung unter den Versuchsbedingungen ein. Selbst bei 100° C war nach drei Stunden die Pektinase noch nicht völlig zerstört. Bei den Bestimmungen der Tabelle 6 wurde nicht das Trockenpräparat, sondern die einprozentige *Pektinase-lösung* während drei Stunden *bei verschiedenen Temperaturen* gehalten. Es wurde außerdem noch der Einfluß verschiedener Zusätze auf die Thermostabilität untersucht.

Tabelle 6

*Einfluß der Temperatur auf die Stabilität von wäßrigen Pektinaselösungen ohne und mit Zusatz von Protektoren*

**Konstant:**

Behandlungsdauer der Pektinase (vor der Aktivitätsbestimmung): 3 Stunden.  
Natriumpektat (Veresterungsgrad 0 %):

Nrn. 1—3: 0,560 Milliäquivalent;  $Z_0$ : 0,620

Nrn. 4—10: 0,610 Milliäquivalent;  $Z_0$ : 0,625

Nrn. 11—13: 0,680 Milliäquivalent;  $Z_0$ : 0,474.

Pektinase I: 5 mg

pH: 4,0 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 60 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 20° C

Reaktionsdauer: 3 Stunden.

**Variabel:**

Temperatur bei der Behandlung der Pektinase (vor der Aktivitätsbestimmung): 20 bis 70° C.

(Vorbehandlung: stets 5 mg Pektinase mit in der Tabelle angegebener Menge Schutzstoff, aufgefüllt mit Wasser auf je 2,5 cm<sup>3</sup>.)

Nr.	Zusatz (Protektor) mg	Temperatur bei der Vorbehandlung					
		20° C	30° C	40° C	50° C	60° C	70° C
		Z in % von $Z_0$					
1	Ohne Zusatz . . . . .	50,2	49,8	68,2	100	—	—
2	200 mg Rohrzucker . . . . .	50,2	50,1	53,0	70,4	100	—
3	20 mg Rohrzucker . . . . .	50,2	50,0	68,5	100	—	—
4	20 mg Pektinsäureglykolester	50,1	50,0	51,3	55,7	70,2	100
5	20 mg Na-Alginat . . . . .	50,0	49,6	52,1	56,5	72,0	100
6	10 mg Na-Alginat . . . . .	50,2	50,2	55,3	69,4	94,2	100
7	2 mg Na-Alginat . . . . .	50,1	50,1	62,5	85,2	100	—
8	10 mg Gelatine . . . . .	50,2	50,1	52,3	56,8	73,0	100
9	5 mg Gelatine . . . . .	50,2	50,2	55,5	70,0	97,4	100
10	1 mg Gelatine . . . . .	50,0	50,2	64,4	90,2	100	—
11	20 mg Glyzerin . . . . .	49,9	49,9	50,2	66,9	97,4	100
12	10 mg Glyzerin . . . . .	50,0	50,0	50,9	74,9	100	—
13	2 mg Glyzerin . . . . .	50,0	50,2	51,4	82,4	100	—

Ohne Zusatz war unter den Versuchsbedingungen bereits bei 50° C vollständige Inaktivierung zu beobachten. Sicher wäre weitgehender gereinigte Pektinase noch hitzelabiler. Bei 30° C war noch keine Denaturierung feststellbar. Durch die verschiedenen Zusätze wurde zum Teil eine bedeutende Erhöhung der Thermostabilität hervorgerufen. Relativ geringen Schutz gewährte der Rohrzucker. Die übrigen untersuchten Zusätze erwiesen sich als geeignete Protektoren. Glyzerin schützt fast ebensogut wie die Polyuronide (Natriumalginat und Pektinsäure-Glykol-

ester). Die Gelatine vermochte die Thermoresistenz am meisten zu steigern. Durch Zusätze gelang es, die partielle Inaktivierung bis zu 40° C praktisch völlig zu verhindern und die völlige Enzym-Denaturierung von 50 bis auf 70° C zu verschieben. Es scheint erwähnenswert, daß bei den 13 Versuchen bei 20° C alle Werte für Z in Prozenten von Z<sub>0</sub> in dem engen Intervall von 49,9 bis 50,2 % liegen, obwohl für die Bestimmungen drei verschiedene Natriumpektate verwendet wurden.

Die Messungen der Tabellen 7 und 8 zeigen die Empfindlichkeit der Pektinase gegenüber *verdünntem Alkali*. Es wurden die Konzentration der Natronlauge und die Behandlungsdauer variiert. Die Alkalieinwirkung auf die Pektinase vor der Aktivitätsbestimmung erfolgte stets in genau gleicher Weise bei 20° C. Je 10 mg der Ausgangspektinase II wurden mit verdünnter Natronlauge versetzt; das Gesamtvolumen betrug stets 5,0 cm<sup>3</sup>. Die Normalität der Natronlauge in diesen Lösungen variierte zwischen 0 und 0,05. Nach der Natronlauge-Behandlung des Enzyms wurde genau mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und durch Zusatz von Natriumchlorid dafür gesorgt, daß alle Enzymlösungen gleichviel Natriumchlorid enthielten. Diese Enzymlösungen wurden dann zu den Pektinlösungen zugegeben, um die Aktivitäten der behandelten Pektinasen zu ermitteln.

Tabelle 7

*Einfluß verschieden konzentrierter Natronlauge auf die Stabilität der Pektinase*

**Konstant:**

Behandlungsdauer der Pektinase bei 20° C (vor der Aktivitätsbestimmung): 4 Std.  
 Polygalakturonsäure (elektrodialysiert): 1,18 Milliäquivalente  
 Veresterungsgrad: 72 % mit Methanol

Z<sub>0</sub>: 0,253

Pektinase II: 10 mg

pH: 3,1

Totalvolumen beim Abbau: 50 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 40° C

Reaktionsdauer: 2 Stunden.

**Variabel:**

Konzentration der Natronlauge bei der Behandlung der Pektinase (vor der Aktivitätsbestimmung): 0—0,05 n.

Pektinase vor NaOH-Zugabe: unbehandelt, dialysiert oder elektrodialysiert.

NaOH-Konzentration	o	n/60	n/40	n/20	o	n/60	n/40	n/20
	Z in % von Z <sub>0</sub>				Aldehyd %			
Enzym unbehandelt	53,8	62,4	75,1	100	13,75	10,0	6,25	0
Enzym dialysiert	60,4	71,5	84,0	100	11,75	7,5	4,25	0
Enzym elektrodialysiert	64,8	75,5	94,5	100	10,5	6,25	1,00	0

Bereits durch Dialyse der Pektinaselösung und in noch etwas stärkerem Maße durch Elektrodialyse hat die Aktivität des Enzyms deutlich abgenommen. Die Stabilität der Pektinase gegenüber Alkali scheint

beim gereinigten Enzym noch etwas geringer zu sein als bei der Rohpektinase. Durch 0,05-n-Natronlauge wurde die Pektinase in allen Fällen nach vier Stunden völlig zerstört. Verdünnteres Alkali führte nur zur partiellen Denaturierung. Die viskosimetrischen Messungen und die Endgruppenbestimmungen ergeben im Prinzip durchaus das gleiche Bild. In der folgenden Tabelle 8 wurde die Inaktivierung des in 0,05-n-Natronlauge gelösten Fermentes mit der Zeit verfolgt.

Tabelle 8

*Einfluß von 0,05-n-Natronlauge auf die Stabilität der Pektinase*

**Konstant:**

Behandlung der Pektinase bei 20° C (vor der Aktivitätsbestimmung) mit NaOH der Normalität: 0,05 n

Polygalakturonsäure (elektrodialysiert): 1,18 Milliäquivalente

Veresterungsgrad: 72 % mit Methanol

$Z_0 = 0,308$

Pektinase II: 10 mg

pH: 3,1

Totalvolumen beim Abbau: 50 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 30° C

Reaktionsdauer: 2 Stunden

**Variabel:**

Einwirkungsdauer der Natronlauge auf die Pektinase (vor der Aktivitätsbestimmung): 0—120 Minuten

Einwirkungsdauer der NaOH in Minuten	0	10	20	30	40	50	60	90	120
Z in % von $Z_0$	54,0	88,0	93,2	97,6	100	100	100	100	100
Aldehyd % . .	12,75	2,75	0,75	0,25	0	0	0	0	0

Bereits nach 40 Minuten trat völlige Denaturierung der Pektinase ein. Beide Methoden ergaben das gleiche Resultat. Es zeigte sich außerdem, daß auch die Alkaliresistenz durch Zusätze, wie zum Beispiel Natriumsulfit, erhöht werden kann. Die Pektinase ist bedeutend empfindlicher gegenüber Alkali als die Pektase. Ganz entsprechend liegt das pH-Optimum der Pektinase (3,9) auch bei einer saureren Reaktion als das der Pektase (pH-Optimum zirka 6,5). Es ist bekannt, daß man durch Säurebehandlung die Pektase eines Pektinase-Pektase-Gemisches zerstören kann. Ähnlich gelingt es, durch Alkalibehandlung die Pektinase eines solchen Gemisches ohne völlige Inaktivierung der Pektase zu denaturieren.

Über spezifische Inhibitoren der Pektinase ist bisher wenig bekannt (siehe Abschnitt 2,5). Für die Aufklärung der aktiven Gruppen des Pektinase-Eiweißes wäre die Kenntnis spezifischer Hemmstoffe von größter Bedeutung. Durch unspezifische Eiweiß-Denaturierungsmittel, wie zum Beispiel Formaldehyd, wird natürlich auch die Pektinase zerstört. Durch Jod, schweflige Säure, Borsäure und Schwefelwasserstoff

tritt jedoch keine Verminderung der Aktivität ein. Nach Otto und Winkler (1942) sollen  $\alpha$ -Aminosäuren wie Glykokoll die in Amylasepräparaten vorhandene Pektinase inaktivieren. Dazu soll nach Zugabe der wäßrigen Aminosäurelösung zu dem Enzym bei einer 60° C nicht überschreitenden Temperatur eingetrocknet werden. Bei dem Versuch der Tabelle 9 wurde die Pektinase II nach der Vorschrift von Otto und Winkler behandelt. Je 10 cm<sup>3</sup> einprozentige Pektinaselösung wurde mit verschiedenen Mengen Glykokoll versetzt und bei 40° C im Thermostaten mit Luftumwälzung getrocknet. Die eingetrockneten Enzymproben wurden dann zu Pektatlösungen gegeben, um unter stets gleichen Bedingungen auf viskosimetrischem Wege die Aktivität zu ermitteln. Die Resultate der folgenden Tabelle 9 zeigen, daß durch die Behandlung mit Glykokoll bei der verwendeten Pektinase keine Hemmung eingetreten war.

Tabelle 9

*Einfluß von Glykokoll auf die Stabilität der Pektinase*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 1,0 Milliäquivalent

Veresterungsgrad: 0 %

Z<sub>0</sub>: 0,556

Pektinase II: 100 mg

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 50,4 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 40° C

Reaktionsdauer: 150 Minuten

**Variabel:**

Menge des Glykokolls, die vor der Aktivitätsbestimmung während 3 Stunden auf die Pektinase einwirkte.

Glykokoll mg	Z in % von Z <sub>0</sub>
0	6,3
0,4	6,3
4,0	6,8
20,0	6,3
40,0	6,8

**4.2. Aktivität der Pektinase**

*4.21. Einfluß der Wasserstoffionenaktivität, der Temperatur und der Konzentrationsverhältnisse*

Zur Ermittlung des *pH-Optimums* wurden Untersuchungen an allen drei verwendeten Pektinasepräparaten angestellt. Da stets das gleiche Optimum von pH 3,9 festgestellt wurde, sind in der folgenden Tabelle 10 nur die Messungen mit dem Präparat II wiedergegeben.

Tabelle 10

*Einfluß des pH auf die Aktivität der Pektinase*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 1,46 Milliäquivalente

Veresterungsgrad: 67,1 % mit Methanol

Z<sub>0</sub>: 0,260

Pektinase II: 10 mg

Totalvolumen beim Abbau: 50 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 20° C

Reaktionsdauer: 4 Stunden

**Variabel:**

pH: zwischen 1 und 5 (Zitratpuffer)

pH	Z in % von Z <sub>0</sub>	pH	Z in % von Z <sub>0</sub>
1,0	98,4	3,7	20,0
1,5	89,2	3,9	17,3
2,0	73,1	4,0	18,4
2,5	55,0	4,1	21,2
3,0	39,6	4,3	28,1
3,3	26,1	4,5	37,3
3,5	22,7	5,0	84,2

Vom pH-Optimum 3,9 aus nimmt die Aktivität gegen den Neutralpunkt viel stärker ab als gegen saurere Reaktionen. Bereits bei pH 6 ist das Enzym völlig inaktiv. — In der Literatur wird manchmal erwähnt, daß Schimmelpilz-Pektinasen auch noch bei pH 7 wirksam sind. Meist dürfte es sich dabei wohl um eine Täuschung handeln. Die Pektinase beginnt erst zu arbeiten, wenn durch gleichzeitig vorhandene Pektase ein saureres Milieu geschaffen wurde. — Übrigens wäre es einwandfreier gewesen, für diesen Versuch einen durch Pektase nicht angreifbaren Pektinstoff (Glykolester) zu verwenden.

Die Viskositäten der folgenden Tabelle 11 zeigen, daß der rascheste Abbau bei einer *Temperatur* von 40° C stattfand. Es sei jedoch betont, daß hier, wie allgemein für Fermente, das Temperatur-Optimum sehr unscharf definiert ist. Es gilt stets nur für die jeweiligen Versuchsbedingungen. Allgemein gilt, daß mit längerer Versuchsdauer die optimale Temperatur tiefer liegt. Dies zeigt sich klar an Bestimmungen von Weitnauer (1946). — Das pH-Optimum liegt meist in einem Bereich, in dem durch die vorhandenen Wasserstoff- oder Hydroxylionen noch keine irreversible Denaturierung zu befürchten ist.

Tabelle 11

*Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der Pektinase*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 0,560 Milliäquivalent

Veresterungsgrad: 0 %

Z<sub>0</sub>: 0,620

Pektinase I: 5 mg

pH: 4,0 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 60 cm<sup>3</sup>

Reaktionsdauer: 3 Stunden

**Variabel:**

Temperatur beim Abbau: 20—70° C

Temperatur	Z in % von Z <sub>0</sub>
20	50,2
30	43,2
40	40,8
50	43,0
60	63,6
70	91,6

Aus den Bestimmungen der Tabelle 12 geht hervor, daß die Pektinase bei 60° C nach der ersten Stunde das Substrat kaum mehr angreift. Es ist also recht bald völlige Inaktivierung eingetreten. Die Hitzedenaturierung ist bereits bei den Stabilitätsuntersuchungen der Tabellen 5 und 6 untersucht worden.

Tabelle 12

*Abbau von Pektat durch Pektinase bei 60° C*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 0,560 Milliäquivalent

Veresterungsgrad: 0 %

Z<sub>0</sub>: 0,620

Pektinase I: 5 mg

pH: 4,0 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 60 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 60° C.

**Variabel:**

Reaktionsdauer: 5 bis 180 Minuten.

Reaktionsdauer in Minuten	Z in % von Z <sub>0</sub>
5	96,4
10	92,3
15	88,2
30	78,2
60	67,0
120	63,6
180	63,5

Von großem Interesse wäre die Ausführung von Versuchen, bei denen systematisch die *Pektinase- und die Pektinkonzentration* variiert werden. Dann ließe sich z. B. die Affinität zwischen Enzym und Substrat nach den Vorschlägen von Michaelis und Menten (1913) oder von Lineweaver und Burk (1934) bestimmen. In den beiden folgenden Tabellen 13 und 14 sind nur zwei orientierende Bestimmungen wiedergegeben, die jedoch die komplizierte Kinetik des pektolytischen Abbaus vermuten lassen.

Tabelle 13

*Einfluß der Pektinasekonzentration auf den Abbau von Pektat*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 1,44 Milliäquivalente

Veresterungsgrad: 0 %

Z<sub>0</sub>: 0,253

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 50 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 40° C

Reaktionsdauer: 1 Stunde.

**Variabel:**

Konzentration der Pektinase II: 2,5—100 mg.

Pektinase mg	Z in % von Z <sub>0</sub>	Aldehyd %	Pektinase mg	Z in % von Z <sub>0</sub>	Aldehyd %
0	100	0	40	20,1	3,50
2,5	69,6	0,75	50	17,8	3,75
5,0	52,6	1,50	60	15,4	3,75
7,5	45,8	2,25	70	14,2	4,00
10	36,9	2,50	80	13,4	4,25
20	29,2	3,00	90	13,4	4,25
30	23,7	3,25	100	13,4	4,25

Unter den Bedingungen des Versuches der Tabelle 13 erwies sich die Leistung einer Gewichtseinheit Pektinase um so geringer, je höher die Enzymkonzentration war. Nach den Endgruppenbestimmungen war bei kleinen Enzymmengen der Abbau der Enzymkonzentration proportional. Dann wird der Anstieg der Aldehydgruppen immer geringer, um von 80 mg Pektinase an gleich 0 zu werden. Bei Zunahme der Enzymmenge von 80 auf 100 mg war auch keine weitere Abnahme der Viskosität mehr zu beobachten. — Die Abhängigkeit der Reaktion von der Enzymkonzentration dürfte jedoch je nach den übrigen Versuchsbedingungen verschieden sein.

Aus dem Versuch der Tabelle 14 geht noch hervor, daß mit zunehmendem Reaktionsvolumen, d. h. mit steigender Verdünnung, die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt. Dieses Verhalten zeigt, daß der

enzymatische Pektinabbau nicht als eine monomolekulare Reaktion betrachtet werden darf. Übrigens ist bei der Anwendung der Gleichung für Reaktionen erster Ordnung auf Versuche, bei denen der Pektinabbau zeitlich verfolgt wird, stets festzustellen, daß die « Reaktionskonstante » nicht konstant ist, sondern mit der Zeit absinkt.

Tabelle 14

*Einfluß der Verdünnung auf die Aktivität der Pektinase*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 1,18 Milliäquivalente

Veresterungsgrad: 54,2 % mit Methanol

Z<sub>0</sub>: 0,331

Pektinase II: 10 mg

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Temperatur beim Abbau: 20° C

Reaktionsdauer: 2 Stunden.

**Variabel:**

Totalvolumen beim Abbau: 21,31 und 41 cm<sup>3</sup>.

Totalvolumen cm <sup>3</sup>	Z in % von Z <sub>0</sub>
21	50,2
31	57,7
41	61,6

*4,22. Einfluß von Zusätzen*

Bereits aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß die Aktivität der Pektinase durch Alkalichloride bedeutend erhöht werden kann (P a l l m a n n, M a t u s, D e u e l und W e b e r, 1946). Art und Konzentration des Elektrolyten sind von Bedeutung. Daher sollte auch beim Studium der pH-Abhängigkeit der Pektinase die Konzentration des Puffers konstant gehalten werden. — In der folgenden Tabelle 15 wurde der Einfluß einiger Elektrolyte untersucht.

Vor der Viskositätsbestimmung wurde den Lösungen stets die gleiche Menge an Natriumhexametaphosphat zugesetzt, um eine Ausfällung des Pektates zu verhindern. Es zeigt sich, daß ein Salz die Pektinase um so stärker aktiviert, je höher die *Wertigkeit des Kations* ist. Besonders deutlich ist der Übergang vom 1-wertigen Na zum 2-wertigen Ca. — Bei den früheren Untersuchungen wurde gefunden, daß die Elektrolyt-Aktivierung durch die Alkalichloride gesetzmäßig vom Li bis zum Cs ansteigt.

Da immer wieder beobachtet wurde, daß die Aktivität eines Pektinasepräparates während des Pektinabbaus abnimmt, wurde versucht festzustellen, ob durch die Reaktionsprodukte eventuell eine Hemmung verursacht wird. Es ist ja z. B. bekannt, daß Fruktose die Invertase

Tabelle 15

*Einfluß von Elektrolyten auf die Aktivität der Pektinase*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure (elektrodialysiert): 1,18 Milliäquivalente

Veresterungsgrad: 72 % mit Methanol

Z<sub>0</sub>: 0,313

Pektinase II: 10 mg

pH: 3,1

Totalvolumen beim Abbau: 50 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 30° C

Reaktionsdauer: 2 Stunden

Zusatz nach Enzymaktivierung: 0,5 g Na-Hexametaphosphat.

**Variabel:**

Elektrolytzusatz beim Abbau. Verschiedene Konzentrationen an NaCl, CaCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub> und Th (NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>.

cm <sup>3</sup> Elektrolytlösung	0	1	2	3	0	1	2	3
	Z in % von Z <sub>0</sub>				Aldehyd-%			
n NaCl	69,5	62,9	56,8	53,8	9,50	11,75	13,00	13,75
0,1 n CaCl <sub>2</sub>	69,2	59,6	49,7	42,9	9,50	12,25	15,00	17,00
0,1 n AlCl <sub>3</sub>	69,2	57,4	45,5	37,8	9,50	12,75	16,25	18,75
0,05 n Th (NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	69,6	61,8	56,0	52,8	9,50	11,50	12,25	14,25

etwas zu hemmen vermag. In der Tabelle 16 sind deshalb einige Messungen ohne und mit Zusatz von Galakturonsäure, dem monomeren Baustein der Pektinsäure, wiedergegeben.

Tabelle 16

*Einfluß von Galakturonsäure auf die Aktivität der Pektinase*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 1,18 Milliäquivalente

Veresterungsgrad: 0 %

Z<sub>0</sub>: 0,360

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Pektinase II: 10 mg

Totalvolumen beim Abbau: 60 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 20° C

Reaktionsdauer: 2 Stunden.

**Variabel:**

Zusatz von Galakturonsäure: 0, 100 und 200 mg.

Galakturonsäure mg	Z in % von Z <sub>0</sub>
0	23,0
100	22,5
200	22,5

Durch die zugesetzte Galakturonsäure ist also keine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit verursacht worden. Wahrscheinlich spielt für den starken Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Zeit eine irreversible Enzymdenaturierung während des Abbaus eine gewisse Rolle. Von Bedeutung ist vielleicht auch, daß die Affinität der Pektinase zum Pektin im Laufe der Hydrolyse abnimmt. (Dies geht aus den Messungen der Tabelle 17 hervor.)

#### 4,23. Einfluß des Polymerisationsgrades der Polygalakturonsäure

Es wurde vermutet, daß *cet. par.* auch der *Polymerisationsgrad* der Pektinstoffe für die Reaktionsgeschwindigkeit von Bedeutung ist. Bei verschiedenen Amylasen ist es wahrscheinlich, daß die Affinität des Enzyms zur Amylose mit der Verminderung der Kettenlänge abnimmt. Um eine solche Vermutung bei der Hydrolyse durch Pektinase zu prüfen, wurden Versuche mit Natriumpektaten verschiedenen Molekulargewichtes ausgeführt. Zunächst wurde ein Natriumpektat durch Einwirkung von Pektinase während verschieden langen Zeiten bis zu verschiedenen Stufen abgebaut. Diese Hydrolyse wurde durch Aufkochen aliquoter Teile der Reaktionslösung unterbrochen. Von dem Ausgangspektat und seinen 6 Abbauprodukten wurde die Viskosität und der Gehalt an Aldehydgruppen bestimmt. Diese 7 verschiedenen Natriumpektate wurden nun neuerdings unter genau gleichen Bedingungen mit Pektinase abgebaut. Um einen möglichst einwandfreien Vergleich zu ermöglichen, enthielten alle Lösungen bei dieser Hydrolyse die gleiche Menge an glykosidischen Bindungen. Es waren stets 0,825 Milliäquivalente glykosidische Bindungen der Natriumpektate durch die Pektinase spaltbar. Je stärker die Präparate bereits vorher abgebaut waren, desto mehr Gesamtpektat mußte natürlich verwendet werden, damit überall die gleiche Menge an noch nicht gespaltenen glykosidischen Bindungen vorhanden war. In der Tabelle 17 werden zunächst die 7 Natriumpektate durch ihre Viskosität ( $Z_0$ ) charakterisiert. Außerdem werden dann die Milliäquivalente Natriumpektat, die bei der Aktivitätsbestimmung verwendet wurden, angegeben. In der dritten Spalte der Tabelle finden sich dann der Prozentsatz an glykosidischen Bindungen, der von den gesamten 0,825 Milliäquivalenten hydrolysiert wurde. Diese Zahl wird wie bei den übrigen Versuchen als Aldehyd-% bezeichnet. Der Abbau kann hier verständlicherweise nicht durch die Abnahme der Viskosität demonstriert werden, da ja bereits die Ausgangspektate verschiedene Zähigkeitszahlen besitzen. — Für diesen Versuch wurden je 40 mg des besonders aktiven Pektinase-Präparates III verwendet.

Tabelle 17

*Einfluß der Kettenlänge von Natriumpektat auf die Aktivität der Pektinase*

**Konstant:**

Gehalt an glykosidischen Bindungen des Na-Pektates: 0,825 Milliäquivalent

Veresterungsgrad: 0 %

Pektinase III: 40 mg

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 200 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 25° C

Reaktionsdauer: 20 Stunden.

**Variabel:**

Z<sub>0</sub>: von 0,596 bis 0,014 (Maß für die Kettenlänge)

Natriumpektatkonzentration: von 1,000 bis 2,060 Milliäquivalente

(Mußte bei Konstanz der glykosidischen Bindungen zwangsweise variiert werden.)

Zähigkeitszahl der Natriumpektate Z <sub>0</sub> anfangs	Milliäquivalent Na-Pektat	Aldehyd %
0,596	1,000	61,7
0,312	1,070	54,9
0,244	1,130	52,4
0,143	1,260	44,6
0,042	1,620	29,1
0,014	1,920	19,4
0,014	2,060	17,0

Der Versuch der Tabelle 17 wurde zweimal ausgeführt. Die Wiederholung ergab praktisch das gleiche Resultat. Bei der Versuchsanordnung mußte leider neben der Kettenlänge des Natriumpektates auch dessen Konzentration von Lösung zu Lösung geändert werden. Die Abnahme der Pektinase-Aktivität mit abnehmendem Molekulargewicht des Pektates ist sehr deutlich. Es darf daraus wohl geschlossen werden, daß die Affinität der Pektinase bei steigender Kettenlänge des Pektinstoffes ansteigt. Weitere Versuche über den Einfluß des Molekulargewichtes der Pektinstoffe sind erwünscht.

*4,24. Einfluß des Veresterungsgrades der Polygalakturonsäure*

Für die folgenden Untersuchungen wurde nur der *Glykolester der Pektinsäure* verwendet. Die verschiedenen *Veresterungsgrade* wurden wie unter 3,1 besprochen durch partielle Verseifung mit Natronlauge hergestellt. Wiederholt wurde genau geprüft, ob bei der alkalischen Verseifung ein viskosimetrisch nachweisbarer Kettenabbau oder eine Zunahme der Aldehydgruppen, eventuell durch eine unerwünschte Oxydation, eintritt. Dies wurde jedoch in keinem Falle beobachtet. Bereits in Tabelle 3 wurde ein Versuch mitgeteilt, der deutlich zeigte, daß die fermentative Spaltung der glykosidischen Gruppen von Pektinstoffen durch die Veresterung der Karboxylgruppen (am C-Atom 6)

sehr stark beeinflusst wird. In der folgenden Tabelle 18 ist neben dem Veresterungsgrad auch noch die Temperatur bei der Enzymeinwirkung variiert worden.

Tabelle 18  
Einfluß des Veresterungsgrades und der Temperatur  
auf die Aktivität der Pektinase

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 1,44 Milliäquivalente

Z<sub>0</sub>: 0,253

Pektinase II: 10 mg

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 50 cm<sup>3</sup>

Reaktionsdauer: 30 Minuten.

**Variabel:**

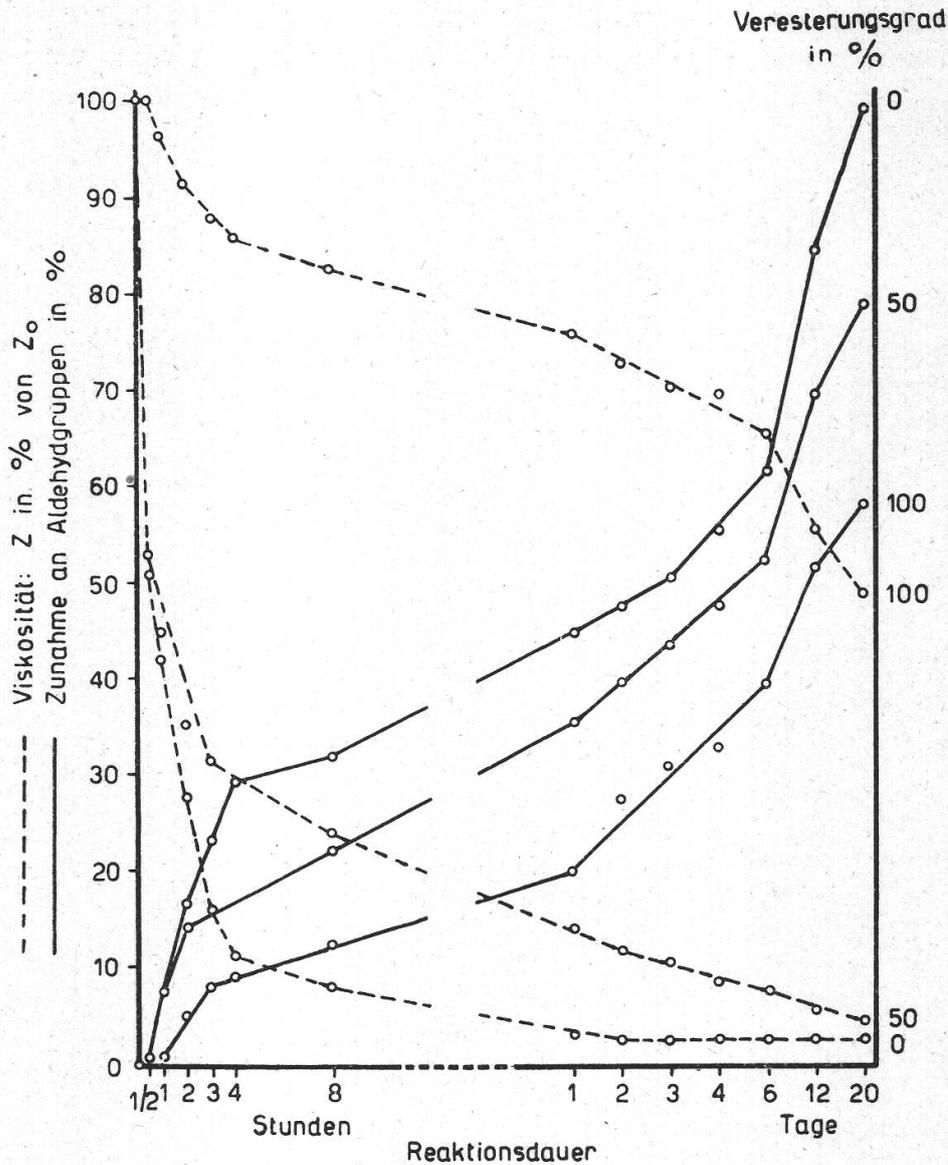
Veresterungsgrad: 0 bis 100 % mit Glykol

Temperatur beim Abbau: 3 bis 70° C.

Temperatur ° C	Veresterungsgrad %									
	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
	Z in % von Z <sub>0</sub>					Aldehyd-%				
3	100	94,6	87,8	84,6	92,9	—	—	—	—	—
20	100	83,6	70,4	66,0	75,1	—	—	—	—	—
30	100	68,0	53,0	46,7	51,8	0	0	0,25	0,75	0,25
40	93,7	55,8	40,6	34,7	43,1	0	0,25	0,25	1,25	1,25
50	90,9	50,4	32,0	29,2	40,0	0,75	1,50	2,00	3,00	2,25
60	98,3	75,0	56,4	48,9	52,1	2,25	2,25	3,00	4,00	3,25
70	94,1	71,0	53,0	43,4	47,8	3,00	3,00	4,00	5,25	4,50

Bei den Versuchen der Tabelle 18 hat nur ein relativ geringer fermentativer Abbau stattgefunden, daher zeigen auch die viskosimetrischen Bestimmungen bedeutend deutlichere Unterschiede als die Endgruppenbestimmungen. Die ganz schwache Hydrolyse bei 3 und 20° C war noch nicht durch eine Zunahme der Aldehydgruppen erkennbar, obwohl schon deutliche Abnahmen der Viskosität zu verzeichnen sind. Bei allen Veresterungsgraden ist deutlich, daß eine Temperatursteigerung (nach den viskosimetrischen Messungen nur bis 60° C) die Degradation sehr stark zu beschleunigen vermag. — Von besonderem Interesse ist der Einfluß des Veresterungsgrades. Im allgemeinen zeigt sich nach beiden Methoden eine deutliche Förderung der enzymatischen Hydrolyse mit abnehmendem Veresterungsgrad. Bemerkenswert ist, wie bereits bei den Ergebnissen der Tabelle 3, daß der rascheste Abbau nicht bei einem Veresterungsgrad von 0, sondern von 25 % erfolgte. Der Grund dafür ist schwer ersichtlich, aber der Unterschied zwischen den Veresterungsgraden 0 und 25 % scheint durch die zahlreichen Experimente gesichert zu sein. — Besonders zu betonen ist

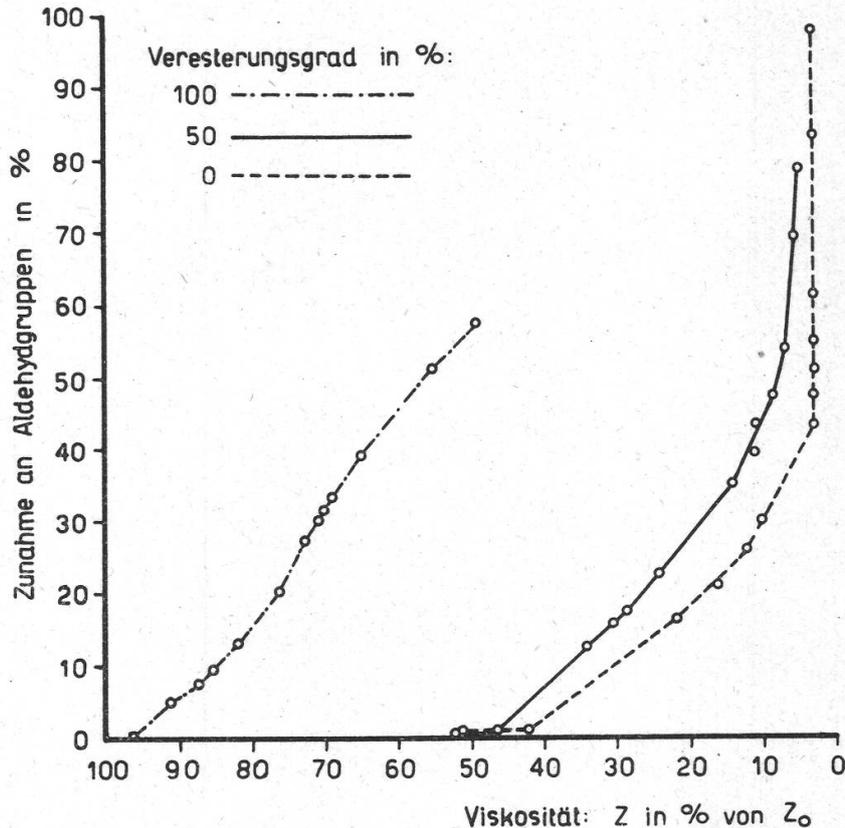
noch, daß bei den höheren Temperaturen selbst der 100-prozentige Glykolester von der Pektinase angegriffen wird. Es scheinen also nicht, wie bisher angenommen wurde, unveresterte Karboxyle für die enzymatische Hydrolyse notwendig zu sein. Der Abbau ist nicht etwa durch



Figur 1  
Einfluß des Veresterungsgrades und der Reaktionsdauer auf die Aktivität der Pektinase (Tabelle 20)

nicht-fermentative Hydrolyse eingetreten; es wurde nämlich jeder Versuch auch mit inaktiviertem Enzym ausgeführt, und dabei trat keine Veränderung der Pektinstoffe ein. Der geringe Abbau des 100-prozentigen Glykolesters hätte vielleicht darauf zurückgeführt werden können, daß noch einzelne Karboxyle unverestert waren und wegen einer schwa-

chen Alkalinität der Asche bei der Titration nicht feststellbar waren. Es ist aber wohl wahrscheinlicher, daß auch völlig veresterte Pektinsäure enzymatisch angreifbar ist. — Besonderes Interesse beansprucht die Beziehung zwischen Aldehydgruppen und Viskosität. Die Zunahme der Aldehydgruppen und die Abnahme der Viskosität sind beide als Ausdruck des Makromolekülabbau zu bewerten. Wenn nun die Pektin-degradation stets in genau gleicher Weise erfolgt, muß erwartet wer-



Figur 2  
Einfluß des Veresterungsgrades und der Reaktionsdauer auf die Aktivität der Pektinase (Tabelle 20)

den, daß eine eindeutige Funktion zwischen Viskosität und Endgruppen besteht. Wenn man — mit anderen Worten — die Zunahme an Aldehydgruppen auf der Abszisse eines Koordinatensystems aufträgt und die Abnahme der Viskosität auf der Ordinate, so sollten alle Punkte der verschiedenen Versuche auf einer Kurve liegen. Ein Blick auf die Tabelle 18 zeigt sofort, daß dies nicht der Fall ist. Bei gleicher Zunahme an Aldehydgruppen, das heißt gleicher Anzahl von Sprengungen glykosodischer Gruppen, hat die Viskosität um so weniger abgenommen, je höher der Veresterungsgrad ist. So wurde zum Beispiel in den Fällen, in denen 3 % der glykosidischen Bindungen gespalten waren,

bei einem Veresterungsgrad:

von 100 %	die Viskosität	auf 94,1 %	(70° C)
» 75 %	»	» 71,0 %	(70° C)
» 50 %	»	» 56,4 %	(60° C)
» 25 %	»	» 29,2 %	(50° C)

erniedrigt. Diese bedeutenden Unterschiede lassen auf prinzipielle Unterschiede im Abbaumechanismus bei den verschiedenen Veresterungsgraden schließen. — In den Tabellen 19 und 20 und den Figuren 1 und 2 wurde nochmals bei zwei verschiedenen Präparaten des Pektin-säure-Glykolesters der Einfluß des Veresterungsgrades genau geprüft. Bei 30° C wurde der Abbau zeitlich verfolgt, und zwar wiederum sowohl durch viskosimetrische als auch durch Endgruppenbestimmungen.

Tabelle 19

*Einfluß des Veresterungsgrades auf die Aktivität der Pektinase (I)*

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 1,44 Milliäquivalente

Z<sub>0</sub>: 0,253

Pektinase II: 10 mg

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 50 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 30° C.

**Variabel:**

Veresterungsgrad: 0 bis 100 % mit Glykol

Reaktionsdauer: bis 15 Stunden.

Reaktions-dauer	Veresterungsgrad %									
	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
	Z in % von Z <sub>0</sub>					Aldehyd-%				
5 Minuten	100	87,0	85,0	81,0	89,7	0	0	0	0	0
10 Minuten	100	83,0	76,3	72,0	81,0	0	0	0	0	0
20 Minuten	100	73,9	61,7	55,3	63,3	0	0	0	0	0
30 Minuten	100	67,6	53,0	46,6	51,8	0	0,25	0,25	0,75	0,25
1 Stunde	96,8	61,3	45,0	35,5	43,1	1,75	2,50	3,00	3,50	2,50
3 Stunden	88,2	50,2	30,9	18,0	16,2	8,50	13,00	15,50	19,75	19,75
6 Stunden	85,0	47,8	26,9	12,0	9,9	11,00	14,75	18,75	25,50	26,00
15 Stunden	79,0	45,0	19,7	8,7	6,7	16,25	17,50	25,75	30,50	30,50

Die Ergebnisse der Tabellen 19 und 20 stehen mit denen der Tabellen 3 und 18 durchaus im Einklang. — Es zeigt sich deutlich, daß die beiden Methoden verschiedene Empfindlichkeitsbereiche besitzen: Am Anfang des Abbaus ist bereits eine starke Viskositätsverminderung feststellbar, auch wenn die Aldehydgruppen noch nicht merklich zugenommen haben. Andererseits läßt sich bei bereits stark abgebauten

Präparaten der Abbau nicht mehr weiter viskosimetrisch verfolgen, da die Viskosität der Lösung fast gleich der des Lösungsmittels ist. Bei diesen niederviskosen Lösungen braucht jedoch noch lange nicht die maximale Menge an Aldehydgruppen freigelegt zu sein.

Tabelle 20

*Einfluß des Veresterungsgrades auf die Aktivität der Pektinase (II.)*

Siehe Fig. 1 und 2.

**Konstant:**

Polygalakturonsäure: 1,01 Milliäquivalente

Z<sub>0</sub>: 0,316

Pektinase II: 10 mg

pH: 3,9 (Zitratpuffer)

Totalvolumen beim Abbau: 51 cm<sup>3</sup>

Temperatur beim Abbau: 30° C.

**Variabel:**

Veresterungsgrad: 0 bis 100 % mit Glykol

Reaktionsdauer: bis 20 Tage.

Reaktionsdauer	Veresterungsgrad %									
	100	75	50	25	0	100	75	50	25	0
	Z in % von Z <sub>0</sub>					Aldehyd-%				
30 Minuten	100	67,7	53,1	46,5	51,8	0	0,25	0,25	0,75	0,50
1 Stunde	97,0	61,3	45,2	35,4	43,0	0,25	1,00	1,25	1,75	1,25
2 Stunden	91,7	52,5	35,4	21,8	25,3	5,00	10,25	13,25	16,50	14,50
3 Stunden	88,5	50,3	31,0	18,0	16,1	8,25	12,50	15,75	21,00	21,25
4 Stunden	86,0	49,3	29,1	13,0	12,0	9,25	13,25	17,50	29,25	25,75
8 Stunden	83,2	46,2	24,0	9,8	8,8	12,78	16,75	22,75	31,75	30,25
1 Tag	76,8	38,3	13,9	5,4	3,2	20,05	26,25	35,50	42,00	44,50
2 Tage	73,0	34,5	11,4	4,7	2,5	27,50	32,25	39,50	45,75	47,75
3 Tage	70,8	32,9	10,4	4,1	2,5	31,00	37,75	43,50	49,50	51,50
4 Tage	69,6	30,7	8,8	3,5	2,5	33,25	40,20	47,25	53,50	55,50
6 Tage	65,5	28,8	7,6	3,2	2,5	39,50	44,50	52,50	61,00	61,75
12 Tage	55,7	23,4	5,7	3,2	2,5	51,50	57,50	69,25	80,25	84,25
20 Tage	49,3	21,8	4,4	3,2	2,5	57,75	65,25	79,00	94,00	99,00

Bei Reaktionszeiten bis zu 2 Stunden erfolgt wiederum der Abbau am raschesten bei einem Veresterungsgrad von 25 %. Bei längerer Reaktionsdauer nimmt der Umfang der Abbaureaktion regelmäßig vom Veresterungsgrad 100 bis 0 % zu.

Der 100-prozentige Glykolester wird zwar sehr langsam angegriffen, aber bei beiden Präparaten war nach einer Stunde bereits eine geringe Viskositätsverminderung festzustellen. Nach längerer Einwirkung des Fermentes ist dann auch hier eine sehr starke Degradation zu konstatieren. Im Vergleich zu niederveresterten Präparaten ist beim völlig ver-

esterten Produkt bei gleicher Zunahme an Aldehydgruppen die Verminderung der Viskosität viel geringer. Die viskosimetrische Bestimmung erweist sich also für total veresterte Pektinsäure als weniger empfindlich. Die Zunahme an Aldehydgruppen nach längerer Versuchsdauer war sehr erheblich; sie kann unmöglich nur auf solche glykosidische Bindungen zurückgeführt werden, die in Nachbarstellung zu freien Karboxylgruppen stehen.

Die Versuche der Tabellen 19 und 20 zeigen wiederum deutlich, daß der Abbaumechanismus bei den verschiedenen Veresterungsgraden nicht gleich sein kann. Bei gleicher Zunahme an Aldehydgruppen ist ziemlich gesetzmäßig die Viskositätsabnahme um so größer, je niedriger der Veresterungsgrad ist. Bei gleicher Anzahl von Endgruppen sind gleich viele Makromoleküle in der Lösung vorhanden. Die verschiedene Viskosität muß dann wohl auf verschiedene Polydispersität zurückgeführt werden. Es scheint, als ob beim 100-prozentigen Glykolester beim Abbau sehr viele kleine Bruchstücke entstehen. Vielleicht wird hier das Fadennolekül bevorzugt vom Ende aus abgebaut.

## 5. Besprechung der Untersuchungsergebnisse

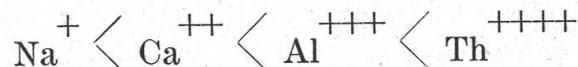
Trotz der zahlreichen Arbeiten, die bereits über den enzymatischen Pektinabbau ausgeführt worden sind (s. Abschnitt 2) erschien es lohnend, weitere Untersuchungen über diesen hydrolytischen Vorgang anzustellen. Durch systematische Variation der Abbaubedingungen kann vielleicht der Reaktionsmechanismus weiter geklärt werden. Da es sich bei der Degradation von Makromolekülen im allgemeinen um einen recht komplizierten Vorgang handelt, ist es empfehlenswert, diesen Prozeß mit Hilfe möglichst vieler verschiedener Methoden zu verfolgen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die fermentative Pektolyse durch viskosimetrische Bestimmungen und durch die Ermittlung der Aldehyd-Endgruppen erfaßt. Sicher wäre es wertvoll gewesen, noch andere Methoden, wie die Bestimmung der optischen Aktivität oder des osmotischen Druckes, zur Charakterisierung der Abbauprodukte heranzuziehen. — Die verwendeten Methoden wurden zunächst in Vorversuchen (s. Abschnitte 3,3 und 3,4) auf Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit untersucht. Es zeigte sich, daß bei geeigneter Versuchsanordnung sowohl die Abnahme der Viskosität als auch die Zunahme an Aldehydgruppen als Maß des eingetretenen enzymatischen Pektinabbaues betrachtet werden können.

### 5.1. Einfluß verschiedener Faktoren

Der Einfluß der *Temperatur* und der *Wasserstoffionenaktivität* auf die Stabilität und Aktivität der verwendeten Schimmelpilz-Pektinase ist

nur graduell von Erfahrungen bei anderen Enzymen verschieden. Die Hitzeresistenz ist geringer als z. B. bei Amylasen. Das saure *pH*-Optimum der Pektinase bei 3,9 läßt bereits vermuten, daß dieses Ferment geringe Alkalistabilität besitzt. Es zeigte sich auch, daß in alkalischer Lösung das Enzym rasch irreversibel zerstört wird; die Pektase, die die Pektinase oft begleitet, ist bedeutend alkaliresistenter, sie besitzt auch meist ein bedeutend höheres *pH*-Optimum. In dieses Bild passen auch die Untersuchungen von Jansen und Macdonnell (1945), die zeigten, daß umgekehrt die Pektinase säurestabiler als die Pektase ist.

Auf welche Weise *Elektrolyte* die Aktivität der Pektinase zu erhöhen vermögen, ist unbekannt; man kann sowohl an eine Beeinflussung des Enzymeiweißes als auch des Pektinstoffes denken. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß bei den Alkalichloriden die Hofmeister'sche Ionenreihe Gültigkeit besitzt. Die Erhöhung der Enzymaktivität nahm regelmäßig vom Lithium bis zum Caesium zu (Pallmann, Matus, Deuel und Weber, 1946). Aus den Messungen der Tabelle 15 ergibt sich, daß bei der Pektinase-Aktivierung auch die Schulze-Hardy'sche Wertigkeitsregel zum Ausdruck kommt. Es konnte folgende Reihenfolge der Kationen festgestellt werden:



Es ist vielleicht von Interesse zu erwähnen, daß in der gleichen Reihenfolge, in der die Salze die Pektinase aktivieren, z. B. die Viskosität wäßriger Pektinlösungen (natürlich ohne Molekülabbau) vermindert wird. — Für diese Versuche dürfen nur relativ hochveresterte Pektine verwendet werden, da die schwach veresterten Pektine durch Elektrolyte leicht ausgeflockt werden. So ist wohl auch zu erklären, daß Chona (1932) und Manville, Reithel und Yamada (1939) eine starke Hemmung der Pektinase durch Magnesium- oder Kalziumsalze fanden. Diese Elektrolyte verursachten wahrscheinlich eine Aggregation der niederveresterten Pektinmakromoleküle, die nicht unbedingt bis zur sichtbaren Flockung fortgeschritten sein muß; dadurch wird die Angreifbarkeit durch Pektinase verständlicherweise stark herabgesetzt. Loconti und Kertesz (1941) verwendeten direkt die Resistenz des Kalziumpektates gegenüber Pektinase für analytische Zwecke.

Über die Spezifität der Pektinase (Polygalakturonase) ist wenig Genaues bekannt. Meist wird angenommen, daß nur die  $\alpha$ -glykosidischen Bindungen von Pektinstoffen hydrolysiert werden. Daß Galaktane nicht angegriffen werden, ist jedoch noch nicht bewiesen worden. — Die Aktivitätsbestimmung von Pektinasepräparaten könnte vereinfacht und vereinheitlicht werden, wenn ein durch die Pektinase hydrolysierbares,

niedermolekulares Glykosid oder Disaccharid bekannt wäre. Die Bestimmungen mit Pektinen als Substrat können selten miteinander verglichen werden, da hochmolekulare Pektine in sehr vielen Eigenschaften von Probe zu Probe verschieden sein können. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen deutlich, daß die Abbaugeschwindigkeit sehr stark von der *Art des verwendeten Pektinpräparates* abhängig ist. Die eindeutige Charakterisierung einer Pektinprobe macht jedoch heute noch größte Schwierigkeiten. Neben dem Reinheitsgrad und dem Veresterungsgrad ist vor allem das Molekulargewicht von Bedeutung. Die gewöhnlichen Analysenmethoden liefern jedoch nur Mittelwerte, auch die Verteilung der Estergruppen über die Fadenmoleküle, die Polydispersität und vielleicht auch der Verzweigungsgrad der Makromoleküle wäre von Interesse (s. Zusammenfassung: P a l l m a n n und D e u e l, 1947). — Es ist mit ziemlicher Sicherheit anzunehmen, daß der *Polymerisationsgrad* (und die Polydispersität) auf die enzymatische Pektolyse von großem Einfluß ist. Bereits bei der Verfolgung des Abbaus mit der Zeit (Tabellen 19 und 20) fällt auf, daß die Reaktion nicht als eine solche erster Ordnung beschrieben werden kann. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse nimmt bedeutend stärker ab. Auch von der Galakturonsäure-Gewinnung her ist dies bekannt. Der Reaktionsverlauf läßt also bereits vermuten, daß das Enzym zu den niedermolekularen Bruchstücken geringere Affinität besitzt als zum hochpolymeren Ausgangspektin (s. auch Messungen bei J a n s e n und M a c d o n n e l l, 1945; D e u e l und W e b e r, 1945). Man muß jedoch immer auch an eine gewisse irreversible Enzyminaktivierung während der Reaktion denken. Bei vielen Enzymreaktionen ist auch bekannt, daß die Reaktionsprodukte hemmend wirken. Es hat sich aber gezeigt, daß abgebautes Pektin (J a n s e n und M a c d o n n e l l, 1945) und Galakturonsäure (Tabelle 16) den Abbau nicht verlangsamten. Nach J a n s e n und M a c d o n n e l l ist vor allem die Digalakturonsäure für die starke Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit verantwortlich zu machen. Ein bereits stark degradiertes Polygalakturonsäuremethylglykosid wurde sehr rasch enzymatisch hydrolysiert. Die beiden amerikanischen Forscher berechneten aus ihren Messungen für den Anfang der Pektolyse eine Michaeliskonstante  $k_m$  von 0,03 % und für den späteren Verlauf von mehr als 1 %. — Sehr deutlich geht aus den Messungen der Tabelle 17 hervor, daß bei gleichem Gehalt der Lösung an Glykosidbindungen die Reaktionsgeschwindigkeit sehr stark mit fallender Kettenlänge absinkt. — Es ist noch unbekannt, ob nur ein Enzym hochpolymeres Pektin bis zum monomeren Baustein abbauen kann. Bei der Hydrolyse der Amylose sind dazu zwei Enzyme nötig (Amylase und Maltase). Auf diesem Gebiet wären noch weitere Untersuchungen von Interesse.

## 5.2. Veresterungsgrad der Polygalakturonsäure

Es ist bei enzymatischen Reaktionen allgemein bekannt, daß bereits geringfügige Veränderungen des Substrates die Reaktionsgeschwindigkeit sehr stark verändern können. Vor allem liegen Erfahrungen bei Glykosiden und niedermolekularen Peptiden vor. Bei hochpolymeren Verbindungen sind erst wenige systematische Untersuchungen ausgeführt worden. Zum Vergleich mit der Pektinase kann die eingehender studierte Amylase dienen. Durch Substitution an der primären Hydroxylgruppe des C-Atomes 6 wird die benachbarte Glykosidbindung weitgehend geschützt (Verzweigung des Makromoleküls wie beim Amylopektin oder z. B. Glykoläther). Ganz ähnlich wird auch durch Veresterung der Karboxylgruppe der Pektinsäure (C-Atom 6) mit Methanol oder Glykol die glykosidische Bindung mehr oder weniger unangreifbar. (S. Abschnitt 2,5.) In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem der Einfluß des *Veresterungsgrades* auf die enzymatische Hydrolyse untersucht. Es zeigte sich, daß nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch der Mechanismus der Reaktion beeinflußt wird.

Die Versuche der Tabellen 3 und 18 bis 20 zeigen deutlich, daß allgemein der Abbau um so langsamer erfolgt, je höher die Pektinsäure mit Glykol verestert ist. Bereits die Anfangsgeschwindigkeiten sind für die verschiedenen Veresterungsgrade verschieden. Merkwürdigerweise zeigt sich bei allen Versuchen während der ersten zwei Stunden der Enzymreaktion, daß die zu 25 % veresterte Pektinsäure etwas rascher als die unveresterte Pektinsäure abgebaut wird. Dies ergibt sich sowohl aus den Bestimmungen der Viskosität als auch aus denen der Endgruppen. Der Grund für diese Erscheinung ist unbekannt. Vielleicht wird bei einem *pH* 3,9 (Zitratpuffer) die elektrolytempfindliche hochpolymere Pektinsäure ankoaguliert. Etwas abgebaute Pektinsäure ist dann wieder gut löslich; bei längerer Enzymeinwirkung ist auch das unveresterte Präparat am weitgehendsten hydrolysiert. Der größte Einfluß des Veresterungsgrades auf die Reaktionsgeschwindigkeit zeigt sich stets beim Übergang vom Veresterungsgrad 100 zu 75 %.

Bei den Versuchen der Tabellen 19 und 20 ist die Zunahme der Aldehydgruppen während der ersten Stunde sehr gering; nach dieser Inkubationszeit steigt die Geschwindigkeit an, um dann immer kleiner zu werden. Berechnet man die Reaktionskonstante *k* nach der Gleichung für monomolekulare Reaktionen, so zeigt sich, daß *k* — abgesehen von den Anfangsstadien — regelmäßig mit der Zeit abnimmt. Einige Berechnungen aus den Endgruppenbestimmungen der Tabelle 19 sind in der folgenden Tabelle 21 zusammengestellt. — Bereits der Verdünnungsversuch der Tabelle 14 läßt erkennen, daß die Pektolyse nicht als Reaktion erster Ordnung behandelt werden kann.

Tabelle 21

Einfluß des Veresterungsgrades auf die Aktivität der Pektinase.  
Berechnung von « Reaktionskonstanten » erster Ordnung. (S. Tabelle 19)

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{100}{100 - x}$$

x = Aldehyd-% zur Zeit t (in Stunden)

Veresterungs- grad %	t = 3 Stunden	t = 6 Stunden
	« Reaktionskonstante » k · 10 <sup>2</sup>	
0	3,18	2,18
25	3,18	2,13
50	2,43	1,50
75	2,01	1,15
100	1,29	0,84

Von besonderem Interesse ist, daß bei längerer Versuchsdauer auch der 100-prozentige Glykolester abgebaut wird. Bei früheren Messungen wurde dies noch nicht beobachtet (Deuel, 1947). Jansen und Macdonnell (1945) stellten bei 100-prozentigem Methylester nur einen minimalen Abbau fest. Es ist durchaus möglich, daß zwischen dem Methyl- und Glykolester Unterschiede bestehen. Vielleicht muß auch berücksichtigt werden, daß mit verschiedenen Pektinasepräparaten gearbeitet wurde; Jansen und Macdonnell haben außerdem ihr Enzym mit Mineralsäure vorbehandelt. Nach 20 Tagen Reaktionsdauer (Tabelle 20) waren mehr als 50 % der glykosidischen Bindungen des 100prozentigen Glykolesters gespalten, die Viskosität war jedoch nur auf 50 % des Ausgangsviskosität gesunken (Tabelle 20). (Bei nieder- veresterten Pektinstoffen braucht nur weniger als 1 % der glykosidischen Bindungen für eine gleiche Viskositätserniedrigung gespalten zu sein.) Für die Pektinase scheint also die freie Karboxylgruppe am Pektinstoff nicht nötig zu sein, obwohl sie eine rasche Hydrolyse begünstigt. Sicher trifft jedoch nicht zu, daß sogar zwei benachbarte, freie Karboxylgruppen für eine angreifbare Glykosidbindung erforderlich sind. Die Messungen der Tabelle 20 zeigen, daß am Ende des Versuches überall mehr glykosidische Bindungen gespalten wurden, als freie Karboxylgruppen vorhanden sind. Übrigens ergibt sich schon aus den Untersuchungen von Jansen und Macdonnell (1945), daß bei ihrem Ausgangspektin mit zirka 36 % unveresterten Karboxylgruppen nach 9 Tagen etwa 59% aller Glykosidbindungen hydrolysiert waren. Ein mit Pektase verseiftes Pektin, das 2,5 % OCH<sub>3</sub> enthielt, wurde völlig abgebaut.

### 5.3. Beziehung zwischen Viskosität und Aldehydgruppen

Durch die gleichzeitige Verfolgung des Abbaus der Makromoleküle mit Hilfe zweier Methoden ist die Diskussion der enzymatischen Hydro-

lyse bedeutend erleichtert. Bei K e r t e s z (1939) und J a n s e n und M a c d o n n e l l (1945) finden sich bereits einige Angaben über die Beziehungen zwischen Viskosität und Aldehydgruppen. K e r t e s z nimmt keine direkte Beziehung zwischen der Abnahme der Viskosität und der Zunahme an Aldehydgruppen an, da er am Anfang der Reaktion bei starker Verminderung der Viskosität noch keine Vermehrung der Endgruppen beobachten konnte. Hier soll jedoch von dem einfachen Bild der fadenförmigen Pektinmakromoleküle ausgegangen werden. Die Messungen der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, daß beide Methoden die Moleküldegradation — wenn auch mit verschiedener Empfindlichkeit — erfassen. So ergibt sich fast stets bei Messungen einer Versuchsserie die gleiche Reihenfolge der Aktivität für beide Bestimmungsmethoden. Völlige Enzymzerstörung wird von beiden Methoden genau gleich registriert (Tabellen 7 und 8), ebenso eine konstante Aktivität (Tab. 13).

Die Zunahme an *Aldehydgruppen* ist ein direktes Maß für den Umfang der Reaktion. Theoretisch sollte sich aus der Endgruppenbestimmung die Zahl der Bruchstücke unmittelbar ergeben, ähnlich wie aus der Messung des osmotischen Druckes. Diese Bestimmung ergibt daher ein arithmetisches Mittel (« number average molecular weight »), da die Bestimmung nur von der Teilchenzahl abhängt. Ein geringer Makromolekülabbau, der die Eigenschaften einer hochpolymeren Verbindung bereits stark verändern kann, ist an den Endgruppen schwer analytisch genau bestimmbar.

Die *Viskosität* ist für die Registrierung des Beginnes der fermentativen Hydrolyse sehr empfindlich. Wenn erst 1 % der glykosidischen Bindungen gespalten ist, kann die Zähigkeitszahl (siehe Abschnitt 3,3) bereits auf die Hälfte gesunken sein. Andererseits kann die Degradation in späteren Stadien, wenn die Viskosität der Lösung fast gleich der des Lösungsmittels ist, mit Hilfe dieser Methode nicht mehr festgestellt werden. Auch die Zähigkeitszahl kann als Maß eines mittleren Molekulargewichtes angesehen werden. Die Verhältnisse liegen aber theoretisch viel komplizierter als bei den Endgruppen. Zunächst ist meist — selbst für monodisperse Systeme — die Beziehung zwischen Viskosität und Molekulargewicht unbekannt. Wenn die S t a u d i n g e r s c h e Viskositätsregel (Proportionalität zwischen spezifischer Viskosität und Molekulargewicht) gilt, hätte man es mit einem gewogenen Mittel (« weight average molecular weight ») zu tun.

Bei polydispersen Systemen — und bei den Pektinstoffen und ihren Abbauprodukten hat man es stets mit solchen zu tun (D u r f e e und K e r t e s z , 1940) — erhält man also nach den beiden erwähnten Methoden verschiedene mittlere Polymerisationsgrade. Die Beziehung zwischen den Resultaten der Viskositäts- und Endgruppenbestimmung kann daher zur Beurteilung der Polydispersität verwendet werden. Würde der Pektinabbau stets nach dem gleichen Mechanismus erfolgen

(z. B. rein statistische Sprengung der Bindungen oder Hydrolyse nur von einem Ende des Fadenmoleküls aus), so sollte zwischen der Zunahme an Aldehydgruppen und der Viskositätsabnahme eine eindeutige Funktion bestehen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß eine solche Beziehung nicht vorliegt. Wenn beim Pektinabbau unter verschiedenen Bedingungen Systeme verschiedener Polydispersität entstehen, muß angenommen werden, daß die Hydrolysen nicht nach dem gleichen Mechanismus abgelaufen sind.

Bei Pektin, das zu 72 % mit Methanol verestert ist (Tabellen 7, 8 und 15), ist bei gleicher Zunahme an reduzierenden Gruppen die Viskosität bedeutend höher als bei völlig verseiftem Pektat (Tabellen 13, 19 und 20). Oder anders ausgedrückt: Für eine gleiche Abnahme der Viskosität ist beim völlig esterfreien Pektat eine geringere Anzahl von Spaltungen glykosidischer Bindungen nötig, zum Beispiel:

Für eine Abnahme der Zähigkeitszahl auf 50 % müssen von den gesamten Glykosidbindungen

beim Pektat . . . . .	0,3—2 %	gespalten werden,
beim Pektin (72 % Meth.)	zirka 15 %	» »
beim Glykolester (100 %)	» 57 %	» »

Deutlich zeigt sich bei den Pektinsäuren, die verschieden stark mit Glykol verestert waren (Tabellen 18 bis 20), daß bei gleicher Zunahme an Aldehydgruppen die Viskosität um so geringer ist, je kleiner der Veresterungsgrad ist. Ein Beispiel ist in Tabelle 22 zusammengestellt.

Tabelle 22

*Einfluß des Veresterungsgrades beim enzymatischen Abbau auf die Beziehung zwischen Viskosität und Endgruppen. (S. Tabellen 19 und 20)*

Veresterungsgrad % (mit Glykol, beim Abbau)	Z in % von Z <sub>0</sub> bei einer Spaltung von 20 % der glykosidischen Bindungen
0	16
25	18
50	26
75	43
100	77

Bei gleicher Anzahl von Makromolekülen und gleicher Grundmolarität ist also die Viskosität des Pektates um so höher, je höher der Veresterungsgrad während des Abbaues war. Dieses Resultat ließe sich beispielsweise so erklären, daß beim hochveresterten Pektinstoff kleinere Bruchstücke vom Kettenende aus abgespalten werden. Bei den niederesterten Substraten scheinen die Bindungen eher rein zufällig gespalten zu werden. Die Ergebnisse drängen den Vergleich mit den Amylasen

auf: Die völlig veresterte Pektinsäure scheint durch eine Pektinase, die analog der  $\beta$ -Amylase arbeitet, angegriffen zu werden; bei den stärker verseiften Pektinstoffen ist noch eine der  $\alpha$ -Amylase ähnliche Pektinase tätig. Doch das Vorhandensein verschieden wirkender Pektinasen ist vorläufig reine Hypothese. Weitere Experimente müssen zur Klärung der enzymatischen Pektindegredation ausgeführt werden.

## 6. Zusammenfassung

1. Zunächst wird eine Übersicht über die biologische, chemische und technische *Literatur* des Enzymes *Pektinase*, das auch als Pektolase oder Polygalakturonase bezeichnet wird, gegeben (Abschnitt 2). Die Pektinase katalysiert die Hydrolyse der  $\alpha$ -glykosidischen Bindungen von Pektinstoffen. Vor allem werden die Verbreitung des Fermentes (oder der Fermente), die wichtigsten Methoden zur Verfolgung des enzymatischen Pektinabbaus und der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Aktivität besprochen. Neben der Verwendung als Filtrationsenzym zur Süßmostgewinnung kann die Pektinase noch für einige andere praktische Zwecke herangezogen werden.
2. Zur Verfolgung der Pektinhydrolyse, die es unter verschiedensten Bedingungen zu untersuchen galt, dienten in der vorliegenden Arbeit Bestimmungen der *Aldehyd-Endgruppen* und Messungen der *Viskosität* (Abschnitt 3,3 und 3,4). Die viskosimetrische Untersuchung wurde stets erst nach Verseifung der Pektinstoffes zu Natriumpektat in verdünnter Natronlauge vorgenommen. Die Brauchbarkeit und Reproduzierbarkeit dieser beiden *Methoden* wurde geprüft. Die Zunahme an Aldehydgruppen und die Abnahme der Viskosität können als Maß für den enzymatischen Abbau betrachtet werden.
3. Die Stabilität der Pektinase gegenüber *verdünnter Natronlauge* ist gering. Bei 20° C wird das Enzym in 0,05 n Natronlauge in wenigen Minuten zerstört (Tabellen 7 und 8).
4. Pektinase-Trockenpräparate zeigen eine bemerkenswerte Stabilität gegenüber höheren *Temperaturen*. Erst bei 80° C ist eine schwache Denaturierung zu beobachten. Wäßrige Pektinaselösungen zeigen bereits nach längerer Lagerung bei 30° C eine schwache, irreversible Inaktivierung. Bei 50° C tritt rasch völlige Zerstörung ein. Die Hitzeresistenz kann jedoch durch Zusätze (Rohrzucker, Glycerin, Gelatine usw.) erhöht werden. Für das Temperatur-Optimum der Pektinase läßt sich, wie allgemein bei Enzymen, kein bestimmter Wert angeben. Wegen der irreversiblen Enzym-Inaktivierung bei höheren Temperaturen liegt das Optimum bei einer um so

tieferen Temperatur, je länger das Enzym auf das Substrat einwirkt. Meist liegen die Werte zwischen 30 und 50° C (Tabellen 5, 6, 11 und 12).

5. Als *pH-Optimum* der verwendeten Pektinase wurde — bei 20° C und mit einem Pektin des Veresterungsgrades 72 % — der Wert 3,9 ermittelt (Tabelle 10). Bereits bei *pH* 6 ist dieses Enzym völlig inaktiv.
6. Der enzymatische Pektinabbau läßt sich *nicht als Reaktion erster Ordnung* beschreiben (Tabellen 14, 19 bis 21). Auch die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Enzymkonzentration läßt auf einen komplizierten Reaktionsmechanismus schließen (Tab. 13).
7. Verschiedene *Elektrolyte*, die die Pektinstoffe nicht zu koagulieren vermögen, aktivieren den enzymatischen Abbau stark. Mit der Wertigkeit des Kations nimmt die Geschwindigkeit der Hydrolyse zu (Tabelle 15).
8. Durch Einwirkung von *Glykokoll* auf die Pektinase konnte keine Hemmung der Pektindegradation beobachtet werden (Tabelle 9).
9. Eine Zugabe von monomerer *Galakturonsäure*, dem Grundbaustein der Pektinstoffe und Endprodukt der enzymatischen Hydrolyse, zeigte keinen Einfluß auf die Aktivität der Pektinase (Tabelle 16).
10. Die Pektinase spaltet die glykosidischen Bindungen von Pektaten um so langsamer, je geringer der *Polymerisationsgrad* des Substrates ist (Tabelle 17).
11. Zum Studium des Einflusses des *Veresterungsgrades* wurden Untersuchungen an Pektinsäure, die verschieden stark mit Glykol verestert war, ausgeführt. *Glykolester* bieten gegenüber den natürlichen Methylestern vor allem den Vorteil, daß sie durch Pektase, die die Pektinase meist begleitet, nicht verseift werden. Je höher der Veresterungsgrad ist, desto langsamer erfolgt der enzymatische Abbau der Makromoleküle. Auch der 100-prozentige Glykolester wird von der Pektinase angegriffen. Die Beziehungen zwischen der Zunahme an Aldehydgruppen und der Abnahme der Viskosität zeigen, daß der Mechanismus der Hydrolyse bei Substraten verschiedenen Veresterungsgrades nicht der gleiche ist. Bei gleicher Zunahme an Endgruppen ist die Viskosität um so stärker erniedrigt, je geringer die Pektinsäure mit Glykol verestert ist (Tabellen 3, 18, 19, 20 und 22).
12. Die Diskussion der Untersuchungsergebnisse (Abschnitt 5) zeigt, daß zur Abklärung des enzymatischen Pektinabbaues weitere Untersuchungen erforderlich sind.

### 7. Literatur

(Von Arbeiten, die am Ende mit einem R. bezeichnet sind, waren nur Referate im Chem. Zentralblatt, Chemical Abstracts usw. zugänglich)

- Allen, L. A., *Nature* **153**, 224 (1944).  
Arthur, J. C., *Ann. Botany* **11**, 491 (1897).  
Baker, F. und Martin, R., *Centr. Bakt.* II **96**, 18 (1937).  
Baker, G. L., *Delaware Agr. Exp. Sta. Techn. Bull.* **204** (1936).  
— und Kneeland, R. F., *Ind. Eng. Chem.* **27**, 92 (1935).  
Barinowa, S. A., *Microbiol. (russ.)* **15**, 313 (1946). R.  
Bary, A. de, *Bot. Z.* **44**, 377 (1886). R.  
Beijerinck, M. W., *Wisk. en Natk.* **31**, 354 (1922). R.  
— u. Delden, A. van, *Kon. Akad. Wetensch., Amsterdam VI*, **2**, 462 (1904).  
Bernauer, K. und Knobloch, H., in *Bamann-Myrbäck, Meth. Fermentforsch. S. 1323* (1941).  
Besone, J. und Cruess, W. V., *Fruit Prod. J.* **20**, 365 (1941).  
Bock, H., in *Bamann-Myrbäck, Meth. Fermentforsch. S. 1914* (1941).  
Bonnet, L., *Teintex* **8**, 175 (1943). R.  
Bose, S. R., *Erg. Enzymforsch.* **8**, 267 (1938).  
— und Sakar, S. N., *Proc. Roy. Soc. B.* **123**, 193 (1937).  
Bourquelot, E., *C. r. (Paris)* **128**, 1241 (1899).  
— und Hérissey, H., *C. r. (Paris)* **127**, 191 (1898); *J. pharm. chim. (6)*, **8**, 145 (1898).  
Brown, H. T. und Morris, G. H., *J. Chem. Soc. Trans.* **57**, 458 (1890). R.  
Brown, W., *Ann. Botany* **29**, 313 (1915); **30**, 399 (1916); **31**, 489 (1917).  
Bruschi, D., *Atti Reg. Acad. Linc., Cl. Sci. Fis. Math. Nat. Ser. (5)*, **21**, 225 (1912). R.  
Burkey, L. A., *Iowa State Coll. J. Sci.* **3**, 57 (1928). R.  
Buston, H. W. und Kirkpatrick, H. F., *Ann. Botany* **45**, 519 (1931).  
Carbone, D. und Marincola-Cattaneo, R., *Arch. Farm. Sperim.* **7**, 39 (1908). R.  
Carré, M. H. und Haynes, D., *Biochem. J.* **16**, 60 (1922).  
— und Horne, S. A., *Ann. Botany* **41**, 193 (1927).  
Charley, V. L. S., *Fruit Prod. J.* **15**, 267 und 359 (1936); *Chem. and Ind.* **18**, 823 (1940); *Food* **14**, 287 (1945). R.  
— Kieser, M. E. und Steedman, J., *Ann. Rpt. Agr. Hort. Res. Sta. Long Ashton S.* 110 (1942).  
Chateau, P., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **49**, 296 (1909). R.  
Chona, B. L., *Ann. Botany* **46**, 1035 (1932).  
Clayson, D. H. F., *Chem. and Ind.* **61**, 516 (1942).  
Coles, H. W., *Plant Physiol.* **1**, 379 (1926).  
Colin, H. und Chadun, A., *C. r. (Paris)* **201**, 407 (1935).  
— und Lemoyne, S., *Bull. soc. chim. biol.* **18**, 1578 (1936).  
Crang, A. und Mitarb., *Ann. Rpt. Agr. Hort. Res. Sta. Long Ashton S.* 199 und 208 (1944).  
Cruess, W. V., *Fruit Prod. J.* **15**, 133 (1938). R.; *Adv. Enzymol.* **3**, 349 (1943).  
Davison, R. F. und Willaman, J. J., *Bot. Gaz.* **83**, 329 (1927).  
Deuel, H., *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **53**, 219 (1943); *Mitt. Lebensmitt. Hyg.* **36**, 41 (1943); *Experientia* **3**, 151 (1947); *Helv. chim.* **30**, 1523 (1947).  
— und Weber, F., *Helv. chim.* **28**, 1089 (1945); **29**, 1872 (1946).  
Düggeli, M., *Schweiz. Z. Forstwesen* **1** (1923); *Mitt. Schweiz. Anstalt forstl. Versuchswesen* **20**, 307 (1937).  
Durfee, W. H. und Kertesz, Z. I., *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 1196 (1940).

- Ehrlich, F., in Oppenheimer-Pincussen, Meth. Fermente **3**, 918 (1927);  
Z. angew. Chem. **40**, 1305 (1927); **43**, 1072 (1930); Biochem. Z. **250**, 525 (1932);  
**251**, 204 (1932); Ber. deut. chem. Ges. **65**, 352 (1932); in Abderhalden,  
Hdb. biol. Arbeitsmeth. **4**, II, 2405 (1936); Enzymologia **3**, 185 (1937).  
— Guttman, R. und Haensel, R., Biochem. Z. **281**, 93 (1935).  
— und Haensel, R., Zellulose-Chem. **17**, 1 (1936).  
Euler, H. von, Allg. Chemie der Enzyme. München, 1910/34.  
Fabergé, A. C., Stain Technol. **20**, 1 (1945). R.  
Fabian, F. W. und Johnson, E. A., Michigan Agr. Exp. Sta. Tech., Bull. **157**  
(1938). R.  
Fellers, C. R., Clague, J. A. und France, R. L., Mass. State Bull. **293**, 42  
(1933). R.  
— und Rice, C. C., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **4**, 286 (1932).  
Fernando, M., Ann. Botany N. S. **1**, 727 (1937).  
Fischer, W. E., Canning Age **18**, 321 (1937). R.  
Fish, V. B. und Dustman, R. B., J. Am. Chem. Soc. **67**, 1155 (1945).  
Flieg, O., Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. **9**, 193 (1930).  
Frémy, E., J. pharm. chim. (2), **26**, 368 (1840).  
Frush, H. L. und Isbell, H. S., J. Res. Nat. Bur. Stand. **33**, 401 (1944).  
Fuller, W. H. und Norman, A. G., J. Bact. **50**, 667 (1946). R.; Iowa Agr. Exp.  
Sta. J. Res. Bull. **334** (1946).  
Gaertner, H., Z. Ver. deut. Zuckerind. **233** (1919). R.  
Gäumann, E. und Böhni, E., Helv. chim. **30**, 24 und 1591 (1947).  
Gortner, R. A., Outlines of Biochemistry. New York, 1929. R.  
Grassmann, W. und Mitarb., Naturwiss. **20**, 639 (1932); Ann. d. Chem. **502**, 20  
(1933); **503**, 167 (1933).  
Green, E. L. und Kertesz, Z. I., New York State Agr. Exp. Sta. Bull. **181**  
(1931). R.  
Green, J. R., Phil. Trans. B. **185**, 385 (1895).  
Griffin, J. H. und Kertesz, Z. I., Bot. Gaz. **108**, 279 (1946).  
Haensel, R., Diss. Breslau, 1934.  
Hajo, Melliand Text. Ber. **21**, 536 (1940).  
Hanes, C. S. und Morris, T. N., Dept. Sci. Ind. Res., Food. Invest. Board **129**  
(1938).  
Hansen, A., Dansk Tidsskr. Farm. **18**, 137 (1944).  
Harding, K. A., Morse, W. J. und Jones, L. R., New York State Agr. Exp.  
Sta. Bull. **11** (1909). R.  
Harter, L. L., J. Agr. Res. **30**, 961 (1925).  
— und Weimer, J. L., J. Agr. Res. **21**, 609 (1921); **22**, 371 (1921); **24**, 861  
(1923); **25**, 155 (1923); Am. J. Botany **10**, 127 und 245 (1923). R.  
Hauman, L., Ann. Inst. Pasteur **16**, 379 (1902). R.  
Henk, H. J., Klepzigs Text. Z. **44**, 827 (1941). R.  
Henkel, H., Deut. Destillateur Z. **58**, 667 (1937). R.  
Hickenbotham, A. R. und Williams, J. L., J. Agr. South Australia **43**,  
491 und 596 (1940). R.  
Hoepe, G. und Treadwell, W. D., Helv. chim. **25**, 353 (1942).  
Hoeßlin, H., Z. Kinderheilkunde **1**, 81 (1911).  
Hübner, E., Diss. Heidelberg, 1940.  
Isbell, H. S., J. Res. Nat. Bur. Stand. **33**, 45 (1944).  
— und Frush, H. L., J. Res. Nat. Bur. Stand. **33**, 389 (1944).  
Jansen, E. F. und Macdonnell, L. R., Arch. Biochem. **8**, 97 (1945).  
— Macdonnell, L. R. und Jang, R., Arch. Biochem. **8**, 113 (1945).  
Jirak, L. und Niederle, M., Vorratspflege und Lebensmitt. **4**, 513 (1941). R.

- Jones, D.R., *Nature* **158**, 625 (1946).
- Jones L.R., *Centr. Bakt. II.* **14**, 257 (1905); *New York State Agr. Exp. Sta. Bull.* **11**, 289 (1909). R.
- Kalliski, S.K. und Mitarb., *Konserven-Ind. (russ.)* **26**, 28 (1938). R.
- Kertesz, Z.I., *New York State Agr. Exp. Sta. Bull.* **589** (1930); *Erg. Enzymforsch.* **5**, 233 (1936); *Food Res.* **3**, 481 (1938); *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2544 (1939); *J. Nutr.* **20**, 289 (1940).
- und Green, E.L., *New York State Agr. Exp. Sta. Bull.* **179**, 3 (1931).
- Klebahn, H., *Ber. deut. bot. Ges.* **48**, 374 (1930); **51**, 318 (1933).
- Korsakowa, M.P. und Nikitin, E.A., *Allruss. Inst. landw. Mikrobiol.* **5**, 37 (1933). R.
- Krumbholz, G., *Obst- und Gemüseverwert. Ind.* **22**, 651 (1935). R.
- Kung-Hsiang, L., *Phytopathology* **32**, 239 (1942). R.
- Lange, F. und Bohne, A., *Medizin und Chemie* **2**, 205 (1934).
- Letzig, E., *Z. Untersuch. Lebensmitt.* **72**, 312 (1936); **84**, 289 (1942).
- Lineweaver, H. und Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
- Loconti, J.D. und Kertesz, Z.I., *Food Res.* **6**, 499 (1941).
- Lüers, H. und Löther, A., *Woschr. Brauerei* **52**, 49 (1935). R.
- Macdonnell, L.R., Jansen, E.F. und Lineweaver, H., *Arch. Biochem.* **6**, 389 (1945).
- Makrinow, I.A. und Tschischowa, A.M., *Centr. Bakt. II.* **79**, 177 (1929).
- Manville, J.A., Reithel, F.J. und Yamada, P.M., *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2973 (1939).
- Marshall, R.E., *Ind. Eng. Chem.* **33**, 285 (1941); *Food Packer* **17**, 49 (1946). R.
- Matida, S. und Tasiro, T., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **15**, 243 (1939). R.
- Maximenko, J.N., *Konserven-Ind. (russ.)* **7** (1937). R.
- Mayo, J.K., *New Phytologist* **24**, 162 (1925). R.
- McColloch, R.J. und Kertesz, Z.I., *J. Biol. Chem.* **160**, 149 (1945).
- Mehlitz, A., *Konserven-Ind.* **17**, 306 (1930); **19**, 539 (1932); **20**, 348 (1933); **43**, 44 (1935); *Z. Untersuch. Lebensmitt.* **68**, 91 (1934); *Congr. internat. techn. chim. ind. agr. Schéveningue* **5**, **II**, 452 (1937); *Süßmost, Braunschweig, 1938*; in *Bamann-Myrbäck, Meth. Fermentforsch.* S. 2865 (1941).
- und Maab, H., *Z. Untersuch. Lebensmitt.* **70**, 180 (1935); *Biochem. Z.* **276**, 66 und 86 (1935).
- und Scheuer, M., *Biochem. Z.* **268**, 345 und 355 (1934).
- Menon, K.P.V., *Ann. Botany* **48**, 187 (1934).
- Michaelis, L. und Menten, M.L., *Biochem. Z.* **49**, 333 (1913).
- Mori, T. und Tokutaro, O., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **16**, 886 (1940). R.
- Mottern, H.H., *Res. Stud. State Coll. Washington* **7**, 153 (1939). R.
- und Cole, H.J., *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2701 (1939).
- Muhlemann, G.W., *Bot. Gaz.* **80**, 325 (1925).
- Neubert, A.M., *Fruit Prod. J.* **23**, 166 (1944).
- und Veldhuis, M.K., *Fruit Prod. J.* **23**, 324 (1944).
- Norman, A.G., *Ann. Botany* **43**, 233 (1929).
- Nowotelnow, N.W. und Barkowskaya, R.I., *Proc. Inst. Sci., Food Ind.* **3**, 5 (1935). R.
- Olliver, M. und Rendle, T., *J. Soc. Chem. Ind.* **53**, 170 (1934).
- Omelianski, W., *Centr. Bakt. II.* **12**, 33 (1904).
- und Komonowa, M., *Arch. sci. biol. St. Petersbourg* **26**, 53 (1926). R.
- Oppenheimer, C., *Die Fermente und ihre Wirkungen*. Leipzig, 1925.
- Orla-Jensen, A.D. und Kluyver, A.J., *Centr. Bakt. II.* **101**, 257 (1939).
- Otto, K. und Winkler, G., *D.R. P.* **729**, 667 (1942).
- Oxford, A.E., *Nature* **154**, 271 (1944).

- Pallmann, H. und Deuel, H., *Chimia* **1**, 27 (1947).  
— Matus, J., Deuel, H. und Weber, F., *Rec. trav. chim. Pays-Bas* **65**, 633 (1946).  
Paton, J. B., *Am. J. Botany* **8**, 471 (1921). R.  
Perrier, A., *C. r. (Paris)* **193**, 547 (1931).  
Peschke, E. und Tobler, F., *Faserforsch.* **4**, 252 (1925). R.  
Phaff, H. J., *Diss. Univ. California*, 1943; R.; *Arch. Biochem.* **13**, 67 (1947).  
— und Joslyn, M. A., *Wallerstein Lab. Comm.* **10**, 133 (1947).  
Pigman, W. W., *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **25**, 301 (1940). R.  
Pilnik, W., *Mitt. Lebensmitt. Hyg.* **36**, 149 (1945); *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **56**, 208 (1946).  
Pitman, G. A. und Cruess, W. V., *Ind. Eng. Chem.* **21**, 1292 (1929).  
Poore, H. D., *Fruit Prod. J.* **14**, 170 und 201 (1935). R.  
Popowa, E., *Microbiol. (russ.)* **4**, 247 (1935). R.  
Potter, M. C. und Forster, M., *Centr. Bakt. II.* **7**, 353 (1901).  
Prévot, A. R. und Raynaud, M., *C. r. (Paris)* **222**, 1531 (1946).  
Proskurjakow, N. J. und Ossipow, F. M., *Biochem. (russ.)* **4**, 50 (1939). R.  
Regna, P. P. und Caldwell, B. P., *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 244 (1944).  
Reinitzer, F., *Z. physiol. Chem.* **23**, 175 (1897).  
Rietz, E. und Maclay, W. D., *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 1242 (1943).  
Rippel, A., *Angew. Botanik* **1**, 78 (1919). R.  
Rogers, H. J., *Biochem. J.* **40**, 1, *Proc. XVII* (1946).  
Rossi, G. und Carbone, D., *Atti Ist. Incor. Napoli* **4**, 1 (1908). R.  
— und Grazia, Santa de, *Centr. Bakt. II.* **15**, 212 (1906).  
Rothschild, H., *Enzymologia* **5**, 359 (1939).  
Ruschmann, G., *Faserforsch.* **1** (1923); *Forschungsdienst* **2**, 245 (1936). R.  
— und Bartram, H., *Centr. Bakt. II.* **102**, 300 (1940); **105**, 326 (1942).  
Schardinger, F., *Centr. Bakt. II.* **14**, 772 (1905); **19**, 161 (1907).  
Schneider, G. G. und Bock, H., *Z. angew. Chem.* **51**, 94 (1938).  
Schoch-Bodmer, H. und Huber, P., *Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges.* **125**, Sess. 161 (1945); *Viertelj. Naturforsch. Ges. Zürich* **92**, 43 (1947).  
Schubert, E., *Schweiz. Z. Obst- und Weinbau* **55**, 428 (1946).  
Serbinowa, N. Y., *Obst- und Gemüseind. (russ.)* **10**, 11 (1939). R.  
Sideris, C. P., *Phytopathology* **14**, 481 (1924). R.  
Silberschmidt, K., *Münch. med. Wochr.* **78**, 1819 (1931). R.  
Sizer, I. W., *Science* **104**, 488 (1946).  
Sjöberg, K., in Klein, *Hdb. Pflanzenanalyse* **4**, 849, 886 und 937 (1933).  
Smith, R. E., *Bot. Gaz.* **33**, 421 (1902). R.  
Stapp, C., in Honamp, *Hdb. Pflanz. Düngerlehre* **1**, 526 (1931).  
Stöckli, A., *Landw. Jahrb. Schweiz* **42**, 1 (1928).  
Strothmann, W. G., *Brennerei Z.* **55**, 13 (1938). R.  
Stuart, N. W. und Emsweller, S. L., *Science* **98**, 569 (1943).  
Svershkov, I. W., *Konserv. Plod. Prom. (russ.)* **4**, 24 (1938). R.  
Tauber, H., *Enzyme Technology*. New York, 1943.  
Täufel, K., *Chem. Z.* **59**, 165 (1935).  
Thaysen, A. C. und Bunker, H. J., *Microbiology of Cellulose, Hemicelluloses, Pectin and Gums*. Oxford, 1927.  
Tucker, L. R., *Ann. Soc. Hort. Sci. Proc.* **38** 225 (1941). R.  
Vasudeva, S., *Ann. Botany* **44**, 469 (1930).  
Waksman, S. A., *Canner* **54**, 45 (1922). R.  
— und Allen, M. C., *J. Am. Chem. Soc.* **55**, 3408 (1933).  
— und Davison, R. F., *Enzymes*. Baltimore, 1926. R.  
Wallerstein, L., *Ind. Eng. Chem.* **31**, 1218 (1939).  
Ward, H. M., *Ann. Botany* **2**, 319 (1888). R.

- Weber, F., Diss. ETH, Zürich, 1944.
- und Deuel, H., Mitt. Lebensmitt. Hyg. **36**, 368 (1945).
- Matus, J. und Schubert, E., Schweiz. landw. Monatsh. **25**, 209 (1947).
- Weimer, J. L. und Harter, L. L., Am. J. Botany **10**, 167 (1923). R.
- Weitnauer, G., Helv. chim. **29**, 1382 (1946); Schweiz. Z. Obst- und Weinbau **55**, 461 (1946).
- Werch, S. C. und Mitarb., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **44**, 366 (1940); **46**, 569 (1941); **48**, 9 (1941); Am. J. Digestive Diseases **8**, 101 (1941); Am. J. Diseases Children **62**, 499 (1941); **63**, 839 (1942); J. Infect. Diseases **70**, 231 (1942). R.
- Widmer, A., Schweiz. Z. Wein- und Obstbau 1937/1941; Mitt. Lebensmitt. Hyg. **25**, 216 (1934).
- Willaman, J. J., Bot. Gaz. **70**, 221 (1920); Minnesota Stud. Biol. Sci. **6**, 333 (1927); Arkiv f. Kemi **10 A**, 1 (1928); Food Ind. **5**, 294 (1933). R.
- und Kertesz, Z. I., New York State Agr. Exp. Sta. Bull. **178** (1931); Fruit Prod. J. **11**, 39 (1931). R.
- Willstätter, R. und Schudel, G., Ber. deut. chem. Ges. **51**, 780 (1918).
- Zeller, S. M., Ann. Missouri Bot. Garden **3**, 439 (1916). R.
- Zimmermann, W., Malsch, L. und Weber, R., Vorratspflege und Lebensmitt. **2**, 271 (1939). R.
-