

## 37. Über den Mechanismus der enzymatischen Verseifung von Pektinstoffen

von J. Solms und H. Deuel.

(14. XII. 54.)

Pektinesterase (Pektase, Pektindemethoxylase) vermag Pektin (Polygalakturonsäure-methylester) unter Abspaltung von Methanol zu verseifen. Sie kommt in höheren Pflanzen als einheitliches, hochspezifisches Enzym vor<sup>1)</sup>. Ferner findet sich Pektinesterase in zahlreichen Mikroorganismen; sie ist hier meist von Polygalakturonase begleitet und auch von geringerer Spezifität<sup>1,2)</sup>.

Pektinesterase höherer Pflanzen verseift die Methylester der Polygalakturonsäure weitgehend unabhängig von ihrem Molekulargewicht<sup>3)</sup>. Trigalakturonsäure-trimethylester, Digalakturonsäuremono- und -dimethylester und Monogalakturonsäure-methylester und ihre Methylglykoside werden nicht angegriffen. Methylester der Polymannuronsäure und Tragant werden nicht verseift. Auch Ester anderer Alkohole der Polygalakturonsäure werden, mit Ausnahme des Äthylesters, der langsam angegriffen wird, nicht verseift<sup>4)</sup>. Die Verseifung erfolgt meist in zwei Phasen, einer raschen Anfangs- und einer langsamen Endreaktion, und selten vollständig<sup>5)</sup>. Auch der Veresterungsgrad der Polygalakturonsäure hat einen Einfluss auf den Enzymangriff<sup>6)</sup>. Das Enzym scheint benachbarte Estergruppen bevorzugt nacheinander zu verseifen. Bei der Verseifung wurde eine Aufspaltung des Substrates in Fraktionen mit verschiedenem Veresterungsgrad nachgewiesen<sup>7)</sup>.

<sup>1)</sup> Z. I. Kertesz & R. J. McColloch, *Adv. Carbohydrate Chem.* **5**, 79 (1950); H. Lineweaver & E. F. Jansen, *Adv. Enzymology* **11**, 267 (1951); H. J. Phaff & M. A. Joslyn, *Wallerstein Lab. Comm.* **10**, 133 (1947).

<sup>2)</sup> E. J. Calesnick, C. H. Hills & J. J. Willaman, *Arch. Biochemistry* **29**, 441 (1950); L. R. MacDonnell, R. Jang, E. F. Jansen & H. Lineweaver, *ibid.* **28**, 260 (1950); R. J. McColloch & Z. I. Kertesz, *ibid.* **13**, 217 (1947); G. B. Mills, *Biochem. J.* **44**, 302 (1949); W. W. Reid, *Nature* **166**, 569 (1950).

<sup>3)</sup> F. Kiermeier, *Liebigs Ann. Chem.* **561**, 232 (1948).

<sup>4)</sup> H. Deuel, *Helv.* **30**, 1523 (1947); Z. I. Kertesz, *J. biol. Chemistry* **121**, 589 (1937); H. Lineweaver & G. A. Ballou, *Federation Proc.* **2**, 66 (1943); H. Lineweaver, E. F. Jansen, L. R. MacDonnell & R. Jang, *ibid.* **5**, 145 (1946); L. R. MacDonnell, R. Jang, E. F. Jansen & H. Lineweaver, *Arch. Biochemistry* **28**, 260 (1950); R. M. McCready & C. G. Seegmiller, *ibid.* **50**, 440 (1954); H. J. Phaff, *ibid.* **13**, 67 (1947).

<sup>5)</sup> C. H. Hills & H. H. Mottern, *J. biol. Chemistry* **168**, 651 (1947); C. H. Hills, C. L. Ogg & R. Speiser, *Ind. Eng. Chemistry* **17**, 507 (1945); C. H. Hills & R. Speiser, *Sci. 103*, 166 (1946); C. H. Hills, J. W. White & G. L. Baker, *Proc. Inst. Food Technol.* **3**, 47 (1942); E. F. Jansen & L. R. MacDonnell, *Arch. Biochemistry* **8**, 97 (1945); G. B. Mills, *Biochem. J.* **44**, 302 (1949); R. Speiser, C. R. Eddy & C. H. Hills, *J. phys. Chemistry* **49**, 563 (1945).

<sup>6)</sup> Z. I. Kertesz, *J. biol. Chemistry* **121**, 589 (1937).

<sup>7)</sup> C. H. Hills, J. W. White & G. L. Baker, *Proc. Inst. Food Technol.* **3**, 47 (1942); C. H. Hills, H. H. Mottern, G. C. Nutting & R. Speiser, *Food Technol.* **3**, 90 (1949); E. F. Jansen & L. R. MacDonnell, *Arch. Biochemistry* **8**, 97 (1945); T. H. Schultz, H. Lotzkar, H. S. Owens & W. D. Maclay, *J. phys. Chemistry* **49**, 554 (1945); R. Speiser, M. J. Copley & G. C. Nutting, *ibid.* **51**, 117 (1947); R. Speiser & C. R. Eddy, *J. Amer. chem. Soc.* **68**, 287 (1946); W. H. Ward, H. A. Swenson & H. S. Owens, *J. phys. Chemistry* **51**, 1137 (1947).

In der vorliegenden Arbeit soll die Kinetik der enzymatischen Verseifung durch Orangenpektinesterase in Abhängigkeit vom Aufbau der Pektinstoffe, von der Menge und Verteilung der Methylestergruppen, der Molekellänge und der Art einiger Substituenten untersucht werden.

Pektinesterase wurde aus Orangenschalen gewonnen und erwies sich weitgehend frei von Polygalakturonase. Pektine mit verschiedenem Veresterungsgrad und statistischer Verteilung der Estergruppen wurden aus gereinigtem Pektin durch vollständige Veresterung mit Diazomethan und anschliessende partielle alkalische Verseifung hergestellt.

Fig. 1 zeigt, dass die enzymatische Verseifung der Pektinstoffe um so rascher erfolgt, je stärker diese alkalisch vorverseift sind. Die Zunahme der Geschwindigkeit ist bis zu einem Veresterungsgrad von 50 % proportional der Anzahl freier Carboxylgruppen; unter 50 % kann keine weitere Zunahme mehr beobachtet werden.

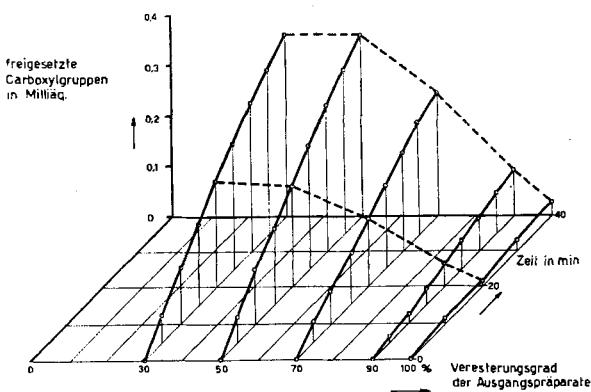


Fig. 1.

Enzymatische Verseifung von alkalisch vorverseiften Pektinen verschiedenen Veresterungsgrades.

Werden nicht nur die Anfangsstadien der enzymatischen Verseifung, sondern die Gesamtreaktionen verfolgt, so können die erwähnten Reaktionsphasen erkannt werden. Die rasche Anfangsreaktion ist um so kürzer, die langsame Endreaktion um so länger, je höher der Ausgangsveresterungsgrad des Pektins ist. In jedem Falle wird der Ester nicht vollständig, sondern zu einem konstanten Endwert, einem Veresterungsgrad von 10,0—11,1 %, verseift.

Fig. 2 zeigt, dass alkalisch vorverseiftes Pektin mit einem Veresterungsgrad von 50 % etwa zehnmal rascher angegriffen wird als enzymatisch vorverseiftes von gleichem Veresterungsgrad.

In Fig. 3 ist die enzymatische Verseifung von Pektinstoffen mit einem Veresterungsgrad von 49 % (alkalisch vorverseift) und verschiedener Kettenlänge dargestellt. Die Geschwindigkeit ist bei allen Präparaten anfänglich gleich gross, nimmt aber bei fortschreitender Reaktion mit abnehmender Kettenlänge stärker ab.

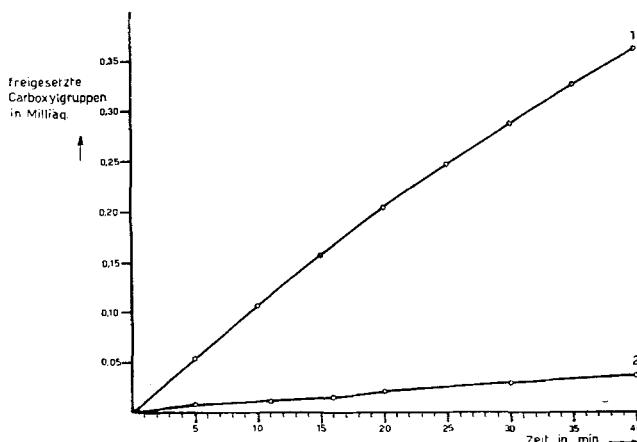


Fig. 2.

Enzymatische Verseifung von alkalisch bzw. enzymatisch vorverseiften Pektinen mit einem Veresterungsgrad von 50%.

1. Alkalisch vorverseiftes Präparat.
2. Enzymatisch vorverseiftes Präparat.

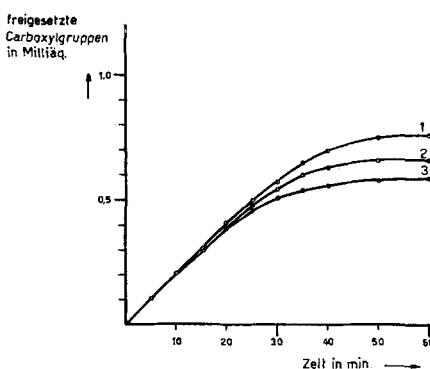


Fig. 3.

Enzymatische Verseifung von Pektinen verschiedener Kettenlänge mit einem Veresterungsgrad von 49%.

1. Ausgangspräparat.
2. Abgebautes Präparat, Aldehydendgruppenzunahme 0,202 Milliäq./g.
3. Abgebautes Präparat, Aldehydendgruppenzunahme 0,430 Milliäq./g.

Ferner wurde die Geschwindigkeit der enzymatischen Verseifung bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Daraus konnten die maximale Verseifungsgeschwindigkeit  $V_{max}$  und die  $K_M$ -Konstante graphisch<sup>1)</sup> und rechnerisch<sup>2)</sup> ermittelt werden (Tabelle 1).

**Tabelle 1.**

Enzymatische Verseifung von alkalisch vorverseiften Pektinen verschiedenen Veresterungsgrades. Bestimmung der  $K_M$ -Konstante und maximalen Verseifungsgeschwindigkeit.

Veresterungsgrad des Ausgangspektins in %	$K_M$ -Konstante Ester Millimol/Liter	$V_{max}$ Ester Millimol/Liter und Min.
30	4,04	0,133
50	2,62	0,121
70	2,36	0,076
• 90	1,55	0,023

Tab. 2 zeigt, dass ein natürliches Pektin mit einem Veresterungsgrad von 69 % etwas rascher von Pektinesterase verseift wird als ein mit Diazomethan verestertes Pektin, das durch alkalische Verseifung auf den gleichen Veresterungsgrad von 69 % vorverseift wurde.

**Tabelle 2.**

Enzymatische Verseifung einiger Pektinstoffe.

Zeit Min.	Natürliches Pektin mit einem V.-G. von 69%	mit Diazomethan vorbehandeltes	Partiell reduziertes Pektin mit einem V.-G. von 66%
Freigesetzte Carboxylgruppen in Milliäq.			
5	0,057	0,052	0,0024
10	0,134	0,101	0,0058
15	0,200	0,149	0,0087
20	0,265	0,192	0,0115
25	0,331	0,232	0,0144

Durch partielle Reduktion der Estergruppen mit Natriumborhydrid zu Galaktose wurde ein Pektin mit einem Gehalt von etwa 8 % Galaktose in der Hauptkette hergestellt. Dieses Präparat wurde von Pektinesterase bedeutend langsamer angegriffen als das Ausgangspektin. Dabei verlief die Verseifung bis zu einem Restestergehalt von 10,0—11,4 %. — Durch Acetylierung der sekundären Hydroxylgruppen des Pektins kann die enzymatische Verseifung stark gehemmt werden.

<sup>1)</sup> W. D. McElroy & B. Glass, The Mechanism of Enzyme Action. Baltimore 1954.

<sup>2)</sup> F. C. Koch & M. E. Hanke, Practical Methods in Biochemistry. Baltimore 1953.

Pektin mit einem Veresterungsgrad von 51 % an Methoxylgruppen und 58 % an Acetylgruppen wurde von Pektinesterase nicht mehr angegriffen. Schliesslich wurden Orangen- und Tabakpektinesterase auf D-Weinsäure-dimethyl- und -monomethylester einwirken gelassen. Entgegen den Angaben der Literatur<sup>1)</sup> wurden diese Verbindungen von Pektinesterase nicht angegriffen.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Geschwindigkeit der enzymatischen Verseifung von Pektinstoffen von der Anordnung der Estergruppen längs den Fadenmolekülen abhängig ist; somit können nicht alle Estergruppen vom Enzym gleich leicht angegriffen werden. Dies kann folgendermassen gedeutet werden: Methylestergruppen mit je einer benachbarten freien Carboxylgruppe auf beiden Seiten sind vom Enzym hydrolyzierbar. Methylestergruppen mit nur einer benachbarten freien Carboxylgruppe zeigen zwei Anordnungsmöglichkeiten; davon ist eine Gruppierung bestimmt und eventuell auch die andere verseifbar. Demnach wird das Enzym von einer freien Carboxylgruppe aus benachbarte Estergruppen einer Fadenmolekel nacheinander hydrolyzieren. — Da die Verseifung in Abhängigkeit vom Ausgangsveresterungsgrad des Pektins in verschiedenen Phasen verläuft und alle Pektine zum gleichen Endwert verseift werden, kann angenommen werden, dass das Enzym die Estergruppen auf der Fadenmolekel in beiden Richtungen verseifen kann, aber in einer Richtung mit erhöhter Geschwindigkeit angreift (Fig. 4). Der grosse Gehalt an enzymatisch nicht angreifbaren Estergruppen muss wohl auf Fehlstellen in der Molekel oder störende Gruppen (Endgruppen, Acetylgruppen, Pentosen) zurückgeführt werden. Der Angriff auf „vollständig“ veresterte Polygalakturonsäure beruht wohl auf der Gegenwart einiger weniger, analytisch nicht nachweisbarer freier Carboxylgruppen.

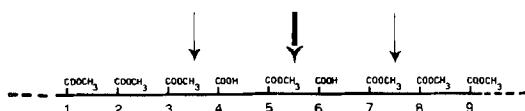


Fig. 4.

Mechanismus des enzymatischen Angriffes von Polygalakturonsäure-methylester (schematisch). Estergruppe 5 wird bevorzugt hydrolysiert; Estergruppen 3 und 7 werden hydrolysiert, davon eine Anordnung bevorzugt; Estergruppen 2 und 8 werden nicht oder nur sehr langsam hydrolysiert.

Der beschriebene Mechanismus erklärt die leichtere Angreifbarkeit alkalisch vorverseifter gegenüber enzymatisch vorverseifter Pektinstoffe. Die enzymatisch vorverseiften Pektine besitzen eine Anordnung mit eher blockartig zusammenstehenden Ester- bzw. Carboxyl-

<sup>1)</sup> C. Neuberg & C. Ostendorf, Biochem. Z. **229**, 464 (1930); H. H. Thornberry, Phytopathology **28**, 202 (1938).

gruppen. Die alkalisch vorverseiften Pektine besitzen dagegen eine Anordnung mit eher einzelnstehenden Ester- bzw. Carboxylgruppen. (Bei der alkalischen Verseifung werden aus elektrostatischen Gründen gerade die Estergruppen, die nicht freien Carboxylgruppen benachbart sind, bevorzugt angegriffen. Daher ist gerade Monogalakturonsäure-methylester und hochverestertes Pektin besonders leicht durch Alkali verseifbar.)

Es darf wohl angenommen werden, dass freie Carboxylgruppen auf der Fadenmoleköl zur Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes notwendig sind. Die starke Hemmung der Enzymtätigkeit bei partieller Reduktion der Estergruppen zu primären Hydroxylgruppen zeigt die ausgeprägte Spezifität des Enzyms; ebenso die Tatsache, dass Polymannuronsäure-methylester, Digalakturonsäure-monomethylester, acetyliertes Pektin und Ester von Polygalakturonsäure mit anderen Alkoholen vom Enzym nicht angegriffen werden. Für die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes sind daher Methoxyl-, Carboxyl-, Hydroxylgruppen und mindestens drei benachbarte Galakturonsäurebausteine von Einfluss. Die Beeinflussung der Enzymreaktion durch Neutralsalz<sup>1)</sup> weist darauf hin, dass zwischen Enzym und Substrat starke elektrostatische Kräfte wirken. Die Enzymmoleköl dürfte wohl stereospezifisch für Galakturonsäure sein und mit den freien Carboxylgruppen der Polysäure in elektrostatischer Beziehung stehen.

Theoretisch ist bei der enzymatischen Pektinhydrolyse eine Reaktion nullter Ordnung zu erwarten, nur bei alkalisch stark vorverseiften Pektinen eine solche erster Ordnung. Experimentell erhält man nicht so eindeutige Ergebnisse wegen zahlreicher störender Faktoren (Inhomogenität des Ausgangspektins in bezug auf Veresterungsgrad und Verteilung der Estergruppen, Molekulargewicht etc.<sup>2)</sup>).

Eine Charakterisierung der Reaktion durch eine  $K_M$ -Konstante ist nicht möglich. Die Zunahme von  $K_M$  und  $V_{max}$  mit abnehmendem Veresterungsgrad deuten auf eine verminderte Affinität bei der Bildung und auf einen beschleunigten Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes. Die verminderte Affinität mit abnehmendem Veresterungsgrad kann auf erhöhte elektrostatische Wechselwirkungen oder auf sterische Faktoren, z. B. eine Verknäuelung der Polygalakturonsäurefadenmoleküle<sup>3)</sup>, beruhen. Der Reaktionsmechanismus der enzymatischen Pektinverseifung ist jedoch noch weitgehend unabgeklärt.

<sup>1)</sup> H. Lineweaver & G. A. Ballou, Federation Proc. **2**, 66 (1943); Arch. Biochemistry **6**, 373 (1945); L. R. MacDonnell, E. F. Jansen & H. Lineweaver, ibid. **6**, 389 (1945).

<sup>2)</sup> E. F. Jansen, L. R. MacDonnell & R. Jang, Arch. Biochemistry **8**, 113 (1945); J. Solms, Schweiz. Zeitschr. Obst- u. Weinbau **63**, 319 (1954).

<sup>3)</sup> H. Deuel & G. Huber, Helv. **33**, 10 (1950).

Die mitgeteilten Untersuchungen zeigen, dass bereits durch geringfügige Veränderungen der Pektinmakromoleküle die Kinetik der enzymatischen Verseifung sehr stark verändert wird (z. B. Einwirkung von Diazomethan, Acetylierung, Reduktion, Alkalibehandlung). Daher können umgekehrt aus der Geschwindigkeit der enzymatischen Verseifung Rückschlüsse auf die Konstitution des verwendeten Pektins gezogen werden. Da Galaktose im allgemeinen ein häufiger Begleitstoff der Pektine ist und natürliche Pektine sehr rasch vom Enzym angegriffen werden, kann angenommen werden, dass die Galaktosebausteine kaum innerhalb der Polygalakturonosäurekette liegen. Zudem gestattet die Bestimmung der Geschwindigkeit der enzymatischen Verseifung unter genau standardisierten Bedingungen Aussagen über die Verteilung der Methylestergruppen längs der Fadenmolekülen der verwendeten Pektinpräparate.

### Experimenteller Teil.

**Gewinnung von Pektinesterase.** 1000 g Orangeschalen wurden bei 0° in Gegenwart von 2000 cm<sup>3</sup> Borat-Acetat-Puffer von pH 8,2 zerkleinert, 1 Std. stehengelassen und filtriert. Die Lösung wurde anschliessend mit Kieselgur klarfiltriert und mit Ammoniumsulfat zu 60% gesättigt. Der Niederschlag wurde abdekantiert, zentrifugiert und mit Wasser auf 400 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 8,2 eingestellt, filtriert und bei 0° aufbewahrt<sup>1)</sup>. Das Enzym erwies sich weitgehend frei von Polygalakturonase.

**Gewinnung von vollständig veresterter Polygalakturonosäure.** Pektin mit einem Veresterungsgrad von 70% wurde mit Diazomethan verestert<sup>2)</sup>.

**Gewinnung von Pektinderivaten und Modellsubstanzen.** Für die Acetylierung wurden 10 g Pektin mit einem Veresterungsgrad (Methanol) von 51 % in 200 g Formamid gelöst und mit 500 g Pyridin und 200 g Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 10 Min. wurde die Reaktionslösung in Äther-Alkohol gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit Salzsäure-Alkohol und Alkohol ausgewaschen und getrocknet<sup>3)</sup>. Der Umfang der Veresterung wurde titrimetrisch mit Hilfe von Ionenaustauschern ermittelt<sup>4)</sup>. — Für die Reduktion wurde Pektin mit einem Veresterungsgrad von 69 % in Wasser gelöst und bei pH 7,0 4 Std. mit einem Überschuss von Natriumborhydrid behandelt. Anschliessend wurde die Lösung gefällt und der Niederschlag mit Salzsäure-Alkohol und Alkohol ausgewaschen und getrocknet<sup>5)</sup>. Der Umfang der Reduktion wurde titrimetrisch ermittelt. — D-Weinsäuremono- und dimethylester wurden durch Kochen von D-Weinsäure in abs. Methanol und fraktionierte Kristallisation der Ester gewonnen<sup>6)</sup>.

**Herstellung der Untersuchungslösungen.** Aus vollständig veresterter Polygalakturonosäure (mit einem Estergehalt von 3,963 Milliäq./g) wurden durch alkalische Verseifung nach folgendem Schema 5 Stammlösungen mit verschiedenem Veresterungsgrad hergestellt, die alle den gleichen Gehalt an Ester- und freien Carboxylgruppen aufwiesen.

<sup>1)</sup> L. R. MacDonnell, E. F. Jansen & H. Lineweaver, Arch. Biochemistry **6**, 389 (1945).

<sup>2)</sup> H. Deuel, G. Huber & R. Leuenberger, Helv. **33**, 1226 (1950).

<sup>3)</sup> J. Solms & H. Deuel, Helv. **34**, 2242 (1951).

<sup>4)</sup> L. Anyas-Weisz, J. Solms & H. Deuel, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **42**, 91 (1951).

<sup>5)</sup> G. Zweifel, unveröffentlichte Untersuchungen, Agr.-chem. Institut ETH.

<sup>6)</sup> C. F. van Duin, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **47**, 713 (1928); W. Marckwald & R. Karczag, Ber. deutsch. chem. Ges. **42**, 1518 (1909).

Veresterungsgrad der Polygalakturon- säure in der End- lösung	Gehalt pro 200 cm <sup>3</sup> Lösung		
	Polygalakturon- säure-methylester Milliäq.	NaOH Milliäq.	Na-Polygalak- turonat Milliäq.
100	4,756	0	11,096
90	5,284	0,528	10,568
70	6,794	2,038	0,058
50	9,512	4,756	6,340
30	15,852	11,096	0

**Enzymatische Verseifung.** Für die Bestimmung der Geschwindigkeit der enzymatischen Verseifung wurden je 50 cm<sup>3</sup> Stammlösung mit 50 cm<sup>3</sup> Wasser, 5 cm<sup>3</sup> 1,0-n. NaCl-Lösung mit 1,0 cm<sup>3</sup> fünffach verdünnter Enzymlösung versetzt. Die Reaktion wurde 40 Min. durch kontinuierliche Titration der freigesetzten Carboxylgruppe mit 0,1-n. NaOH mit einer Glaselektrode bei pH 7,0 ± 0,2 verfolgt (Fig. 1). Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen erwies sich die Geschwindigkeit der Enzymreaktion als der Enzymkonzentration genau und der Substratkonzentration annähernd proportional<sup>1)</sup>. Eine Hemmung des Enzyms durch gebildete Spaltprodukte konnte durch den NaCl-Zusatz weitgehend verhindert werden<sup>2)</sup>. — Für die Bestimmung der K<sub>M</sub>-Konstanten und der maximalen Verseifungsgeschwindigkeit wurden je 5, 10, 25, 50 und 100 cm<sup>3</sup> Stammlösung auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt, mit 5 cm<sup>3</sup> 1,0-n. NaCl-Lösung und 1,0 cm<sup>3</sup> fünffach verdünnter Enzymlösung versetzt. Die Verseifung wurde hier nur während 20 Min. verfolgt. (Tab. 1). — Zur Ermittlung der gesamten verseifbaren Estergruppen in Abhängigkeit vom Ausgangsveresterungsgrad wurden je 20 cm<sup>3</sup> einer 1,5-proz. Lösung von vollständig veresterter Polygalakturonäsäure zur partiellen Verseifung mit steigenden Mengen 0,1-n. NaOH versetzt, 24 Std. stehengelassen, mit 5,0 cm<sup>3</sup> Zitronensäure-Phosphatpuffer von pH 7,0, 2,5 cm<sup>3</sup> 1,0-n. NaCl und 2,0 cm<sup>3</sup> Pektinesteraselösung versetzt und 48 Std. stehengelassen. Anschliessend wurde mit Alkohol gefällt, der Niederschlag mit HCl-Alkohol und Alkohol ausgewaschen, in 25 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und titrimetrisch auf Estergruppen untersucht<sup>3)</sup>. — Zur Ermittlung der Verseifungsgeschwindigkeit von alkalisch und enzymatisch vorverseiften Pektinen wurden je 50 cm<sup>3</sup> Stammlösung mit einem Veresterungsgrad von 100 % mit 5,0 cm<sup>3</sup> 1,0-n. NaCl-Lösung versetzt und enzymatisch resp. alkalisch zu 50 % verseift, aufgekocht und auf 105 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Beide Lösungen wurden nun mit 1,0 cm<sup>3</sup> fünffach verdünnter Pektinesteraselösung versetzt, und die Verseifungen wurden wie beschrieben verfolgt (Fig. 2). — Zur Bestimmung der enzymatischen Verseifung in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Polygalakturonäsäurefadenmolekel wurden je 50 cm<sup>3</sup> einer ca. 1,0-proz. Pektinlösung mit einem Veresterungsgrad von 50 % mit je 5 cm<sup>3</sup> gereinigter Polygalakturonaselösung<sup>4)</sup> versetzt und während 0, 1 und 3 Std. stehengelassen. Anschliessend wurden die Lösungen rasch erhitzt, abgekühlt mit 2,5 cm<sup>3</sup>, 1,0-n. NaCl-Lösung versetzt und wie beschrieben für die enzymatischen Verseifungen verwendet. An Parallelanalysen wurde der Kettenabbau durch Endgruppenbestimmungen mit Natriumhypojodit ermittelt<sup>5)</sup> (Fig. 3). — Die enzymatischen Untersuchungen an den Derivaten und Modellsubstanzen wurden an 1-proz. Lösungen und wie beschrieben ausgeführt (Tab. 2).

Wir danken Herrn A. Denzler für die Mitarbeit bei den Untersuchungen und Herrn dipl. ing. agr. G. Zweifel für die Überlassung des reduzierten Pektins bestens. — Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel aus dem *Weinbaufonds des Eidg. Volkswirtschaftsdepartementes* ermöglicht. Wir danken bestens für diese Unterstützung.

<sup>1)</sup> D. D. van Slyke, *Adv. Enzymology* **2**, 33 (1942).

<sup>2)</sup> H. Lineeweaver & G. A. Ballou, *Arch. Biochemistry* **6**, 373 (1945).

<sup>3)</sup> H. Deuel, *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **53**, 219 (1943).

<sup>4)</sup> L. Anyas-Weisz, *Experientia* **9**, 64 (1953).

<sup>5)</sup> R. Willstätter & G. Schudel, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **51**, 780 (1918).

### Zusammenfassung.

Es wird die Kinetik der enzymatischen Verseifung von verschiedenen Pektinstoffen durch Orangenpektinesterase untersucht. Die enzymatische Verseifung erfolgt stets unvollständig bis zu einem Veresterungsgrad von ca. 10 %.

Alkalisch vorverseifte Pektine (mit eher einzelstehenden Ester- bzw. Carboxylgruppen) werden um so rascher enzymatisch verseift, je geringer ihr Veresterungsgrad ist. Enzymatisch vorverseifte Pektine (mit eher blockartig zusammenstehenden Ester- bzw. Carboxylgruppen) werden unabhängig vom Veresterungsgrad bedeutend langsamer enzymatisch verseift. Daraus ergibt sich, dass den Estergruppen benachbarte freie Carboxylgruppen für die enzymatische Hydrolyse erforderlich sind; zwei Carboxylgruppen wirken stärker beschleunigend als nur eine. — Die  $K_m$ -Konstanten für alkalisch vorverseifte Pektine nehmen mit abnehmendem Veresterungsgrad stark zu.

Die Pektinesterase ist ein hochspezifisches Enzym, dessen Aktivität durch Fremdgruppen in oder an der Pektinfadenmolekel stark vermindert wird. Aus der Kinetik der enzymatischen Verseifung kann auf die Verteilung der Methylestergruppen und die eventuelle Gegenwart von Fremdzuckern innerhalb der Polygalakturonsäurekette geschlossen werden.

Agrikulturchemisches Institut  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

### 38. Recherches sur l'action chimique des décharges électriques.

**XXXVIII. Mesures calorimétriques, électriques et  
oscillographiques sur la production de l'ozone par effluviation de  
l'oxygène, à différentes températures et pressions et à des  
fréquences du courant allant de 11 à 1380 cycles/seconde**

par M. Ricca et E. Briner.

(14 XII 54)

Dans plusieurs mémoires précédents<sup>1)</sup>, des indications ont été données sur les modes opératoires utilisés en vue d'étudier la production de l'ozone par l'effluve électrique dans différentes conditions de pression du gaz effluvé et de fréquence du courant d'effluviation.

Dans les présentes recherches nous avons étendu l'intervalle des fréquences du courant et nous avons surtout porté notre examen sur

<sup>1)</sup> V. Spreter & E. Briner, Helv. **32**, 2044, 2524 (1949); B. Kovaliv & E. Briner, Helv. **35**, 2283 (1952); **36**, 275, 409 (1953).