

Prom. Nr. 3297

Untersuchungen an Galaktomannanen

Von der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften
genehmigte

PROMOTIONSARBEIT

vorgelegt von
PAUL HUI
dipl. Ing.-Chem. E. T. H.
von Wagenhausen (Kt. Thurgau)

Referent: Herr Prof. Dr. E. Hardegger
Korreferent: Herr P.-D. Dr. E. Neukom

Juris-Verlag Zürich
1962

Leer - Vide - Empty

**Meinen lieben Eltern
und
meiner lieben Frau**

Leer - Vide - Empty

Meinen verehrten Lehrern,

Herrn Prof. Dr. Hans Deuel,

dem am 17. Januar 1962 verstorbenen Vorstand des Agrikulturchemischen Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, und

Herrn P.-D. Dr. Hans Neukom,

danke ich für ihre persönliche Anteilnahme und die wissenschaftliche Förderung, die sie mir bei der Ausführung dieser Arbeit stets entgegengebracht haben.

Die vorliegende Arbeit wurde durch finanzielle Mittel der Firma Meypro A.G., Kreuzlingen, ermöglicht, wofür ich bestens danke.

Leer - Vide - Empty

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung	11
2. Experimenteller Teil und Resultate	15
2.1 Materialien	15
2.2 Zusammensetzung und Charakterisierung der Galaktomannane aus den Samen der Guarpflanze und des Johannisbrotbaumes	15
2.21 Extraktion und Löslichkeit der Galaktomannane	15
2.22 Analyse der extrahierten Galaktomannane	18
2.221 Mikroanalysen	18
2.222 Papierchromatographische Untersuchung und Bestimmung des Verhältnisses Galaktose/Mannose der extrahierten Galaktomannane	18
2.23 Optisches Verhalten im polarisierten Licht und Mikroaufnahmen	19
2.24 IR-Spektren von Galaktomannanen	21
2.3 Bestimmung des Molekulargewichtes von Guarán und Carubin	22
2.31 Bestimmung der reduzierenden Endgruppen (number average molecular weight)	22
2.311 Allgemeines	22
2.312 Bestimmung der reduzierenden Endgruppen von Guarán und Carubin	22
2.32 Bestimmung des Molekulargewichtes mit der Ultrazentrifuge (weight average molecular weight)	23
2.321 Allgemeines	23
2.322 Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit	23
2.323 Messung der Diffusionsgeschwindigkeit	24
2.324 Berechnung des Molekulargewichtes	25

2.4 Stabilität und Verhalten von Galaktomannanen in Lösung	26
2.41 Viskositätsänderungen in wässriger Lösung	26
2.411 Viskositätsänderungen beim Stehenlassen der Lösungen	26
2.412 Viskositätsänderungen beim Erhitzen von Galaktomannanlösungen	27
2.413 Abnahme der Viskosität bei Zugabe von Alkalihydroxyd	27
2.42 Bestimmung der Grenzviskosität von Galaktomannanlösungen	30
2.421 Allgemeines	30
2.422 Guaran und Carubin	30
2.423 Enzymatisch behandeltes Guaran	32
2.424 Berechnung der HUGGINS'schen Konstanten	33
2.43 Komplexbildung mit Erdalkalihydroxyden, Aluminium, Zirkonium und Germanium	33
2.431 Komplexbildung mit Erdalkalihydroxyden	33
2.432 Komplexbildung mit Aluminium, Zirkonium und Germanium	34
2.44 Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit von Galaktomannanlösungen nach Zugabe von Alkalihydroxyden	34
2.45 Messung des optischen Drehvermögens von verschiedenen Galaktomannanen in Gegenwart von Elektrolyten	35
2.5 Enzymatische Abspaltung von Galaktose aus Galaktomannanen	39
2.51 Extraktion von α -Galaktosidase aus grünen Kaffeebohnen	39
2.52 Bestimmung der Temperatur- und pH-Optima der extrahierten α -Galaktosidase	39

2.53	Einwirkung von α -Galaktosidase auf verschiedene Galaktomannane	40
2.531	Bestimmung der Aktivität bei einmaliger Enzymzugabe	40
2.532	Bestimmung der Aktivität bei zweimaliger Enzymzugabe	41
3.	Diskussion	43
3.1	Bestimmung der Molekulargewichte	43
3.2	Enzymatische Abspaltung von Galaktose aus Galaktomannanen	46
3.3	Verhalten der Galaktomannane im alkalischen Gebiet	49
4.	Zusammenfassung	59
5.	Literaturverzeichnis	60

Leer - Vide - Empty

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Galaktomannane sind eine wichtige Gruppe von pflanzlichen Schleimstoffen, welche als Reservekohlehydrate, analog der Stärke, vor allem in den Samen vieler Leguminosen vorkommen. Die beiden wichtigsten Vertreter sind das Guar und das Carubin.

Guar kommt im Endosperm der Guarbohnen, *Cyamopsis tetragonoloba* L. oder *C. psoraloides* DC. vor, welche zur Familie der Leguminosen, Gattung Papilionaceae, gehören. Guar ist eine alte Kulturpflanze, die heute vor allem in Indien und Pakistan in grossem Masstab angebaut wird.

Carubin findet sich im Endosperm des Samens des Johannisbrotbaumes, *Ceratonia siliqua* L., welcher ebenfalls zur Familie der Leguminosen, Gattung Caesalpinaceae, gehört. Der Johannisbrotbaum ist vor allem im Mittelmeerraum verbreitet.

Das Endosperm beider Samen besteht bis zu 88 % aus Galaktomannan, einem sog. Pflanzengummi, der in erster Linie als Nährsubstanz für den Keimling dient. Beide Polysaccharide werden heute in grossem Masstab gewonnen. Abb. 1 zeigt den morphologischen Aufbau des Samens der Guarpflanze; Abb. 2 denjenigen des Samens des Johannisbrotbaumes.

Guar enthält 64 % Mannose und 36 % Galaktose, Carubin 80 - 86 % Mannose und 14 - 20 % Galaktose. Die in β (1 \rightarrow 4) glycosidischer Bindung verknüpften Mannosebausteine bilden lange unverzweigte Ketten, an die einzelne Galaktosemoleküle in α (1 \rightarrow 6) Bindungen gebunden sind. Sowohl Mannose als auch Galaktose liegen in der Pyranoseform vor. Guar und Carubin unterscheiden sich vor allem im Verhältnis Galaktose/Mannose, das beim Guar im Mittel 1:2 und beim Carubin 1:4-5 beträgt. Guar und Carubin sind auf Grund ihrer Hexosebausteine demnach als Galaktomannane zu bezeichnen. Durch Röntgenuntersuchungen von Palmer und Ballantyne (43) wurde der Aufbau des Guarans abgeklärt. Der schematische Aufbau des Galaktomannan-Moleküls ist in Abb. 3 dargestellt. Das mittlere Molekulargewicht von Guar wurde von Boggs (8) mit 220 000 angegeben. Kubal und Gralen (36) bestimmten das mittlere Molekulargewicht von Carubin mit der Ultrazentrifuge zu 310 000.

Guar und Carubin sind in organischen Lösungsmitteln unlöslich. In Wasser sind beide Galaktomannane löslich, doch zeigen sie ein unterschiedliches Verhalten in der Löslichkeit. Guar ist bis auf einen kleinen wasserunlöslichen Rückstand kaltwasserlöslich. Durch Erhitzen der in kaltem Wasser gequollenen Dispersion geht Carubin - bis auf einen kleinen wasserunlöslichen Rückstand - vollständig in

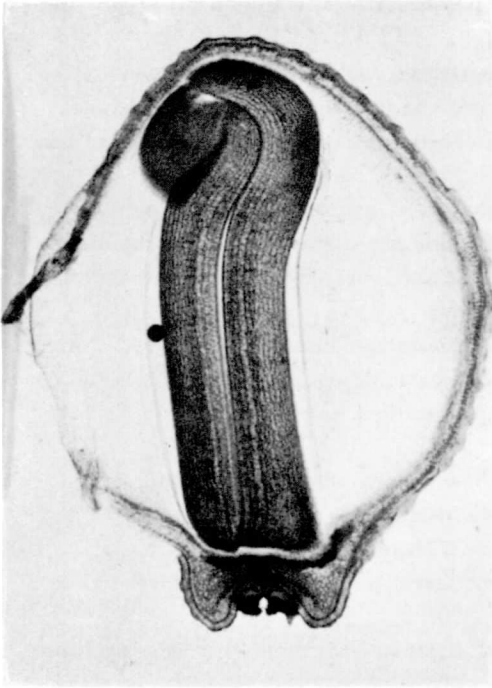


Abb. 1 Querschnitt durch den Samen
der Guarbohne

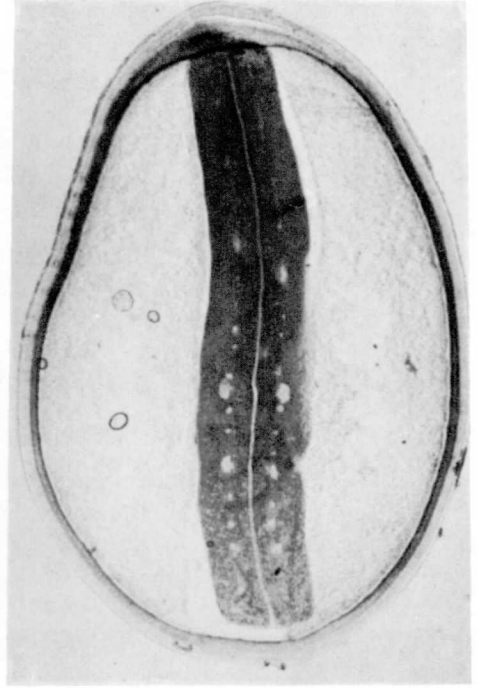


Abb. 2 Querschnitt durch den Samen des
Johanniskrautbaumes

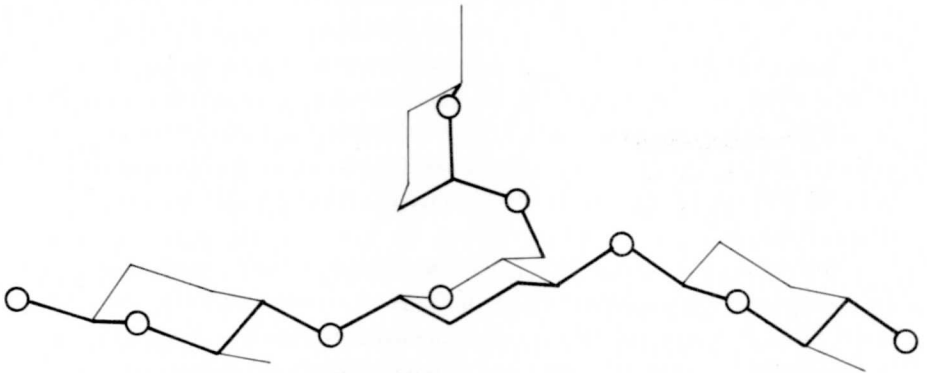


Abb. 3 Schematische Darstellung des Galaktomannan-Moleküls (Guaran)

Lösung. Dieser Unterschied im Verhalten der Löslichkeit ist auf den verschiedenen Gehalt an Galaktose-Seitenästen zurückzuführen. Guarán besitzt etwa die doppelte Anzahl Galaktose-Seitenäste, die eine allzu starke Aggregierung verhindern und dadurch die gute Kaltwasserlöslichkeit bedingen. Carubin besitzt viel weniger Seitenäste und hat dadurch eine grössere Tendenz, Assoziate zu bilden, wodurch sich auch die schlechtere Wasserlöslichkeit erklärt. Ein reines Mannan müsste demnach wasserunlöslich sein, was durch Husemann (32) durch Deacetylierung von Salepmannan bewiesen werden konnte.

Wässrige Lösungen von Guarán und Carubin können durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln oder verschiedenen Elektrolyten ausgefällt werden. Da Galaktomannane keine dissozzierenden Gruppen besitzen, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der Koagulation durch Elektrolyte um eine Komplexbildung handelt. Die Untersuchungen von Deuel und Neukom (18) haben gezeigt, dass die cis-ständigen Hydroxylgruppen an den C-Atomen 2 und 3 der Mannopyranose und diejenigen an den C-Atomen 3 und 4 der Galaktopyranose für die Komplexbildung besonders begünstigt sind. Es ist bekannt, dass nur Polysaccharide mit cis-Diol Gruppierung im alkalischen Bereich unlösliche Kupfer- und Boratkomplexe bilden können. Bei der Ausbildung solcher Komplexe lagert sich ein koordinativ vierwertiges Kupfer- oder Boration zwischen zwei Makromoleküle, wobei diese vernetzt werden. Es kommt dadurch zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzes. Capon und Overend (11) untersuchten die sterischen Unterschiede zwischen der Komplexbildung von cis-Diol Gruppierung enthaltenden Polysacchariden mit Kupfer- und Borationen. Sie zeigten, dass die räumlichen Anforderungen für Ausbildung der beiden Komplexe verschieden sein müssen.

Guaran und Carubin vermögen selbst bei hohen Konzentrationen keine eigentlichen Gele zu bilden, dagegen steigern sie das Geliervermögen in Mischung mit andern gellierfähigen Polysacchariden ganz beträchtlich. Baker et al. (3) und Deuel et al. (19) untersuchten u. a. den Einfluss von Carubin auf die mechanischen Eigenschaften von Carrageen- und Agar-Agar-Gelen und fanden, dass schon geringe Zusätze von Carubin diese Gele bedeutend fester und weniger brüchig machten. Es zeigte sich, dass für die Verstärkung der Agar-Agar-Gele vor allem die heisswasserlösliche Fraktion des Carubins verantwortlich ist (54). Die Erhöhung der Gel-festigkeit durch nicht gellierende Polysaccharide deutet auf deren Beteiligung an der Ausbildung des Gelgerüstes hin.

Guaran und Carubin und ihre Derivate werden heute in grossem Ausmass in den verschiedensten Zweigen der Industrie verwendet. Die wichtigsten Anwendungsgebiete finden sich in der Papierindustrie (16, 53) und Textilindustrie, insbesondere

als Druckverdickungsmittel (33). Es werden heute auch verschiedene Guaran- und Carubinderivate hergestellt. Diese zeichnen sich vor allem durch eine bessere Kaltquellbarkeit und eine grössere Alkalistabilität aus im Vergleich zu den nicht umgesetzten Galaktomannanen.

Die Eigenschaften der Galaktomannane werden vor allem durch den Gehalt an Galaktose-Seitenästen bestimmt. Um nun deren Einfluss auf die Eigenschaften zu studieren, sollte versucht werden, durch Abspaltung der Galaktose-Seitenäste Präparate herzustellen, die sich in ihrem Verhältnis Galaktose/Mannose voneinander unterscheiden. Da enzymatische Reaktionen schonender durchgeführt und besser kontrolliert werden können, sollte die Abspaltung durch eine α -Galaktosidase erfolgen.

Eine der interessantesten und bis heute unerklärlichen Eigenschaften der Galaktomannane ist das Verhalten ihrer wässrigen Lösungen gegenüber Alkali. Je nach Alkali- und Galaktomannankonzentration tritt dabei ein rapider Viskositätsabfall oder eine Gelierung ein. Diese Alkalilabilität der Galaktomannane wurde bis heute nicht systematisch untersucht. Die Wichtigkeit dieses Problems rechtfertigte eine eingehende Untersuchung. Mit Hilfe von Molekulargewichtsmessungen, Bestimmung der Grenzviskosität und der Drehung im alkalischen Gebiet, sollte versucht werden, das Verhalten der Galaktomannane im alkalischen Gebiet zu erklären. Besondere Bedeutung sollte dabei der Konformation, also den sterischen Verhältnissen des Galaktomannan-Moleküls beigemessen werden.

2. EXPERIMENTELLER TEIL UND RESULTATE

2.1 Materialien

Die für die Untersuchungen verwendeten Ausgangsstoffe waren Produkte der Firma Meypro A. G., Kreuzlingen:

Guaran : CSAA	}	Firmenbezeichnungen
Carubin: Lyssogen Alpha		

Es sind dies die reinsten im Handel erhältlichen Qualitäten.

2.2 Zusammensetzung und Charakterisierung der Galaktomannane aus den Samen der Guarpflanze und des Johannisbrotbaumes

2.21 Extraktion und Löslichkeit der Galaktomannane

Die Herstellung der für die Versuche benötigten Lösungen erfolgte immer nach dem gleichen Verfahren, das nachstehend kurz beschrieben wird.

Die wasserlöslichen Extrakte von Guaran wurden nach dem Extraktionsschema auf Tab. I hergestellt.

Die lyophilisierten Galaktomannane konnten nicht mehr vollständig gelöst werden. Aus diesem Grunde wurden die extrahierten Galaktomannanlösungen für die meisten Untersuchungen nicht getrocknet, sondern nach dem Zentrifugieren direkt verwendet. Die Konzentration der Lösungen wurde anschliessend mit Anthron bestimmt (vgl. 2.222).

Für die Extraktion von Carubin gilt das Extraktionsschema nach Tab. II.

Das Galaktomannan der Samen des Johannisbrotbaumes wurde in drei Fraktionen aufgeteilt:

Wasserunlöslicher Rückstand
Kaltwasserlösliche Fraktion (bei 20 - 25°C löslich)
Heiswasserlösliche Fraktion (bei 90 - 98°C löslich)

Die Tatsache, dass Carubin fraktioniert gelöst werden konnte, liess es als angezeigt erscheinen, die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von Guaran und Carubin genauer zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden Proben von 1 g Guaran oder Carubin mit 100 ml Wasser versetzt und während 1 Stunde bei der betreffenden Temperatur gerührt. Das gelöste Galaktomannan wurde mit Alkohol gefällt und bei 50°C 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Die Resultate sind in Abb. 4 aufgezeichnet.

Tab. I Schema für die Extraktion von Guarán

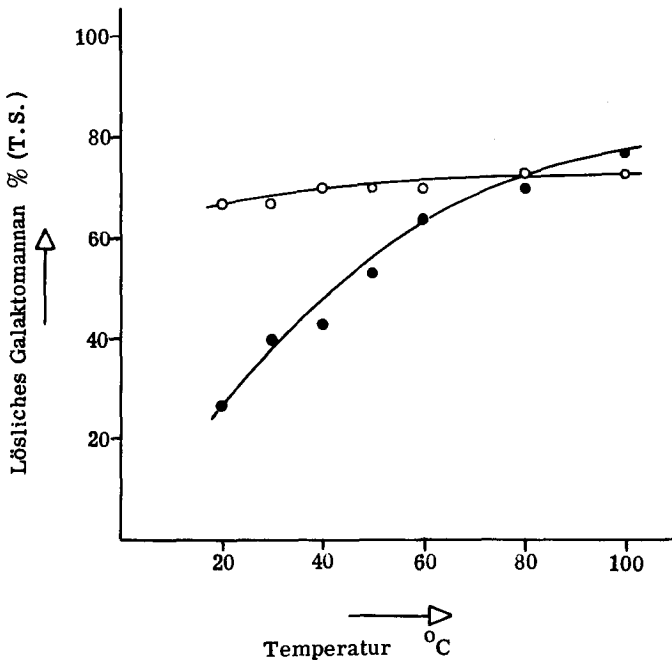
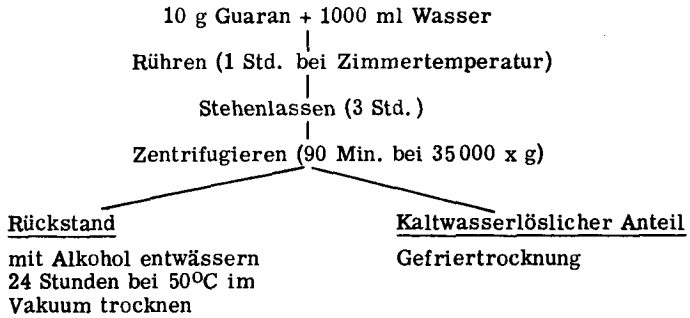
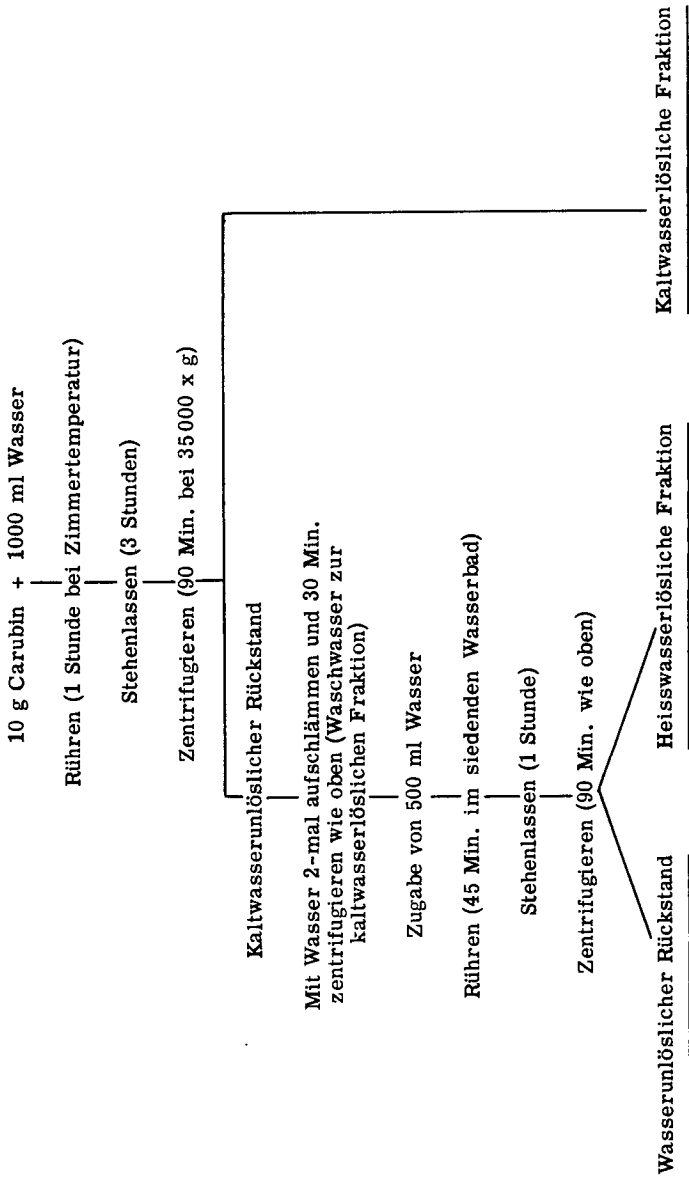


Abb. 4 Löslichkeit von Guarán und Carubin bei verschiedenen Temperaturen

- Guarán
- Carubin

Tab. II Schema für die Extraktion von Carubin



Der wichtigste Unterschied in den Eigenschaften von Guaran und Carubin ist die Fähigkeit des erstern, schon mit kaltem Wasser hochviskose Lösungen zu bilden. Die Untersuchung zeigte, dass in der Löslichkeit der beiden Galaktomannane deutliche Unterschiede bestehen, indem beim Guaran etwa doppelt soviel kaltwasserlöslich ist wie beim Carubin. Der heisswasserlösliche Anteil von Guaran ist nur um ca. 10 % grösser als der kaltwasserlösliche, während die Zunahme bei Carubin 150 % beträgt. Guaran kann also mit guter Ausbeute ohne weiteres bei 40 - 50°C extrahiert werden. Um die gleiche Ausbeute bei Carubin zu erhalten, muss die Temperatur mindestens auf 75°C erhöht werden.

2.22 Analyse der extrahierten Galaktomannane

2.221 Mikroanalysen

Die Mikroanalysen (N und Rückstand) wurden in verdankenswerter Weise durch Herrn Dr. Gysel von der mikroanalytischen Abteilung der CIBA A. G., Basel, ausgeführt. - Die Resultate der mikroanalytischen Bestimmungen finden sich in Tab. III.

2.222 Papierchromatographische Untersuchung und Bestimmung des Verhältnisses Galaktose/Mannose der extrahierten Galaktomannane

Die getrockneten Polysaccharide wurden im zugeschmolzenen Rohr in 0,5 N Salpetersäure (20 mg/ml 0,5 N HNO₃) während 4 Stunden bei 105 - 110°C hydrolysiert. Zur Entfernung der überschüssigen Salpetersäure wurde das schwach gelb gefärbte Hydrolysat mit DOWEX-2 (400 - 600 mesh, Karbonatform) versetzt. Nach dem Nachwaschen wurde das Perkolat konzentriert. Für die rasche qualitative Identifizierung der Zucker wurde die Rundfilterchromatographie nach Rutter (46) verwendet (Laufmittel Aethylazetat-Pyridin-Wasser, 8:2:1; WHATMAN-Papier Nr. 1). Die Laufzeit betrug 15 - 18 Stunden. Die Chromatogramme wurden mit Anilinphtalat entwickelt (44).

Zur Bestimmung des Verhältnisses Galaktose/Mannose wurde mit gleichem Laufmittel und Papier absteigend chromatographiert. Durch Vergleichschromatogramme wurden die Positionen der einzelnen Zucker ermittelt und mit Wasser eluiert. Die quantitative Bestimmung der Zuckerkonzentration in den Eluaten erfolgte kolorimetrisch mit dem Anthrontest nach Morris (40). Die Resultate sind aus Tab. III ersichtlich.

Tab. III Zusammensetzung und Verhältnis Galaktose/Mannose
der extrahierten Galaktomannane

	Guaran	Carubin
Kaltwasserlöslicher Anteil		
Ausbeute	69 %	35 %
Verhältnis Gal/Man	1:1,3	1:1,2
Protein	Spuren	Spuren
Asche	Spuren	Spuren
Heisswasserlöslicher Anteil		
Ausbeute	10 %	52 %
Verhältnis Gal/Man	1:1,7	1:3,3
Protein	Spuren	Spuren
Asche	Spuren	Spuren
Rückstand		
Ausbeute	17 %	10 %
Verhältnis Gal/Man	1:7	1:5,2
Zusammensetzung		
Protein	13 %	28 %
Galaktomannan	33 %	35 %
Rohfaser	54 %	37 %
Asche	Spuren	Spuren

Sämtliche Werte sind auf Trockensubstanz bezogen.

2.23 Optisches Verhalten im polarisierten Licht und Mikroaufnahmen

Guaranmehl CSAA (Abb. 5), mit Alkohol gefällte Guaranfasern (Abb. 6) und ein lyophilisiertes Gemisch von Carubin/Dextrose 1:5 (Abb. 7) zeigten eine im ersten und dritten Quadranten positive Doppelbrechung. Es ist unmöglich, auf Grund der Doppelbrechung Guaran und Carubin voneinander zu unterscheiden. Die Eigenschaft der Doppelbrechung zeigt, dass die Galaktomannane mindestens in gewissen Bezirken eine kristalline Struktur aufweisen müssen. In dieser Beziehung gleichen sie also der Cellulose. Die Doppelbrechung von Carubin wurde von Czaja (17) ausgenutzt, um Carubin in Trockengemischen von Lebensmitteln nachzuweisen. Allerdings ist dieser Nachweis nicht spezifisch.

Abb. 5 - 7 Mikroaufnahmen von Galaktomannanen im polarisierten Licht



Abb. 5 Guaranmehl CSAA



Abb. 6 Guaranfasern, mit Alkohol gefällt

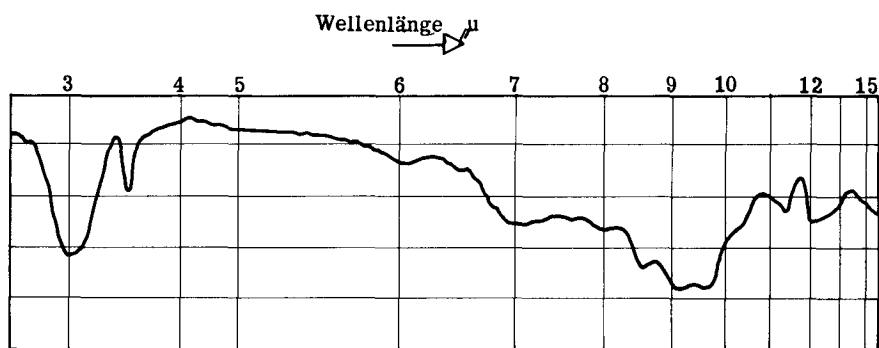


Abb. 7 Carubin/Dextrose 1:5 (lyophilisiert)

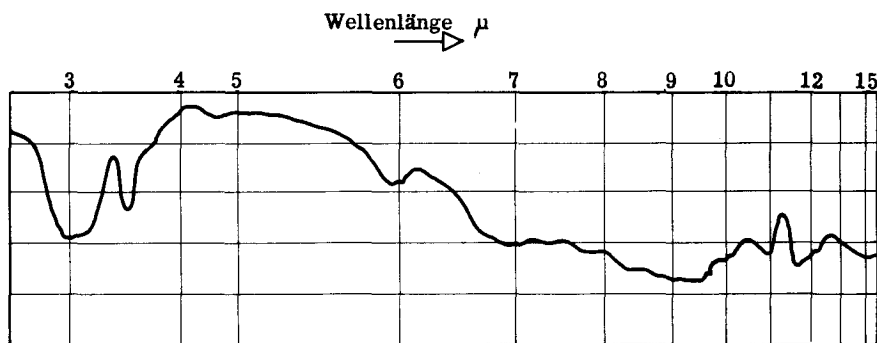
2. 24 IR-Spektren von Galaktomannanen

Die IR-Spektren der lyophilisierten Galaktomannanpräparate von Guarán und Carubin wurden in festem Kaliumbromid mit einem PERKIN-ELMER IR-Spektrophotographen aufgenommen. Abb. 8 zeigt die beiden aufgenommenen Spektren. Die Arbeiten wurden unter Leitung von Herrn P.-D. Dr. Elias vom Technisch-Chemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule durchgeführt. *)

Die Spektren zeigen wohl gewisse Unterschiede zwischen Guarán und Carubin; diese sind aber nicht spezifisch und können auch nicht interpretiert werden; vgl. dazu auch Newburger et al. (42).



GUARAN



CARUBIN

Abb. 8 IR-Spektren von Galaktomannanen

*) Für die Durchführung der Messungen danke ich bestens.

2.3 Bestimmung des Molekulargewichtes von Guarán und Carubin

2.31 Bestimmung der reduzierenden Endgruppen (number average molecular weight)

2.311 Allgemeines

Die Oxydation von Polysacchariden mit Natriumchlorit in Phosphatpuffer wurde kürzlich von Launer und Tomimatsu (38) beschrieben. Für die Molekulargewichtsbestimmungen an Guarán und Carubin mussten die Reaktionsbedingungen wie folgt modifiziert werden:

Die Reaktion wurde bei $25 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ in braunen 75 ml Glasflaschen mit Stopfen, die unbedingt luftdicht verschlossen werden müssen, ausgeführt. Je 10 ml 0,01 M Natriumchlorit (SCHWEIZ. SODAFABRIK, Zurzach) und 3 M Natriumphosphatpuffer (pH 3,14) wurden in die Flaschen pipettiert und 10 g Guarán- oder Carubinlösung von bestimmter Konzentration eingewogen. Bei den Blindwerten wurde an Stelle des Polysaccharids 10 ml Wasser mitbestimmt. Die Reaktionszeit betrug 9 Stunden. Die Reaktion wurde mit 5 ml 1,5 proz. Natriumbicarbonatlösung abgestoppt, wobei der pH auf 5,0 stieg. Das als Nebenprodukt gebildete Chlordioxyd wurde durch Einleiten von Stickstoff (15 Min.) entfernt. Nach Zugabe von 0,5 g Kaliumjodid und 7,5 ml 6 N Schwefelsäure pro Probe wurde das ausgeschiedene Jod mit Natriumthiosulfat titriert. Die Differenz im Natriumthiosulfat-Verbrauch zwischen Blindwert und unbekannter Lösung entspricht der Menge Natriumchlorit, die zur Oxydation der Aldehydgruppe verbraucht wurde.

2.312 Bestimmung der reduzierenden Endgruppen von Guarán und Carubin

Mit Hilfe der in 2.311 angegebenen Reaktionsbedingungen wurden die Molekulargewichte von Guarán und Carubinfraktionen bestimmt. Die Berechnungen und Resultate sind in Tab. IV zusammengestellt.

Tab. IV Bestimmung der Molekulargewichte von Guarán und Carubin

Produkt	Ansatz mg	Verbrauch 0,03 N Na- thiosulfat ml	entspricht μM Mannose (aus der Eich- kurve)	mg Galakto- mannan ent- sprechend 1 μM	Molekular- gewicht (Zahlen- mittel)
Guarán					
heisswasserlöslich	47	0,36	0,19	250	250 000
Carubin					
kaltwasserlöslich	54	0,71	0,37	146	150 000
heisswasserlöslich	39	0,09	0,06	650	650 000
total wasserlöslich	87	0,54	0,29	300	300 000

2.32 Bestimmung des Molekulargewichtes mit der Ultrazentrifuge (weight average molecular weight)

2.321 Allgemeines

Aus zeitlichen Gründen wurde für die Ultrazentrifugen-Messungen nur Guar verwendet. Die Messungen wurden mit einer SPINCO-Ultrazentrifuge, Mod. E-HT bei $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ unter Leitung von Herrn P.-D. Dr. Elias vom Technisch-Chemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule durchgeführt. *)

2.322 Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit

Aus je zwei Aufnahmen wurde über

$$s_{c,t} = \frac{\Delta r}{\bar{r}\omega^2 t} \quad \begin{array}{l} r = \text{Abstand vom Rotationszentrum} \\ \omega = \text{Winkelgeschwindigkeit} \\ t = \text{Zeit} \end{array}$$

nach Svedberg und Pedersen (52) ein scheinbarer Sedimentationskoeffizient $s_{c,t}$ ausgerechnet. Durch die starke Konzentrationsabhängigkeit der reziproken Sedimentationskoeffizienten ist der durch die Sektorform der Zelle hervorgerufene Verdünnungseffekt sehr ausgeprägt. Um zu einem nur noch von der Konzentration abhängigen Sedimentationskoeffizienten s_c zu kommen, wurde daher auf die Position des Meniskus extrapoliert (23):

$$s_c = s_{c,t} + K \left[1 - \left(r_m^2 / r_t^2 \right) \right]$$

wobei K eine Konstante ist und r_m , bzw. r_t die Abstände des Gipfels vom Rotationszentrum an der Position des Meniskus, bzw. zur Zeit t, sind.

Die so erhaltenen Sedimentationskoeffizienten s_c wurden nach

$$1/s_c = (1/s_0) (1 + k_s \cdot c)$$

auf die Konzentration Null extrapoliert (37, 6).

Die bei den einzelnen Konzentrationen erhaltenen Sedimentationskoeffizienten s_c sind in Tab. V zusammengestellt. Die Ausgangskonzentration von 0,58 Proz. wurde mit Anthron (40) spektrophotometrisch bestimmt. Alle andern Konzentrationen wurden durch Verdünnen nach Gewicht hergestellt. Aus der graphischen Auftragung (Abb. 9) errechnet sich ein $s_0 = 8,7$ Svedberg ($1 \text{ Svedberg} = 10^{-13} \text{ sec}^{-1}$) und ein $k_s = 644 \text{ ml/g}$. Das Abbiegen der Kurve bei etwas höheren Konzentrationen zeigt, dass hier die Teilchen schon nicht mehr unabhängig voneinander sedimentieren.

*) Für die Durchführung dieser Messungen und zahlreiche Diskussionen möchte ich Herrn P.-D. Dr. Elias bestens danken.

Tab. V Sedimentationskoeffizienten von Guaran

Konzentration c g/ml	Sedimentationskoeffizient s_c Svedberg
0,00580	2,00
0,00388	2,48
0,00193	3,83
0,00118	4,92

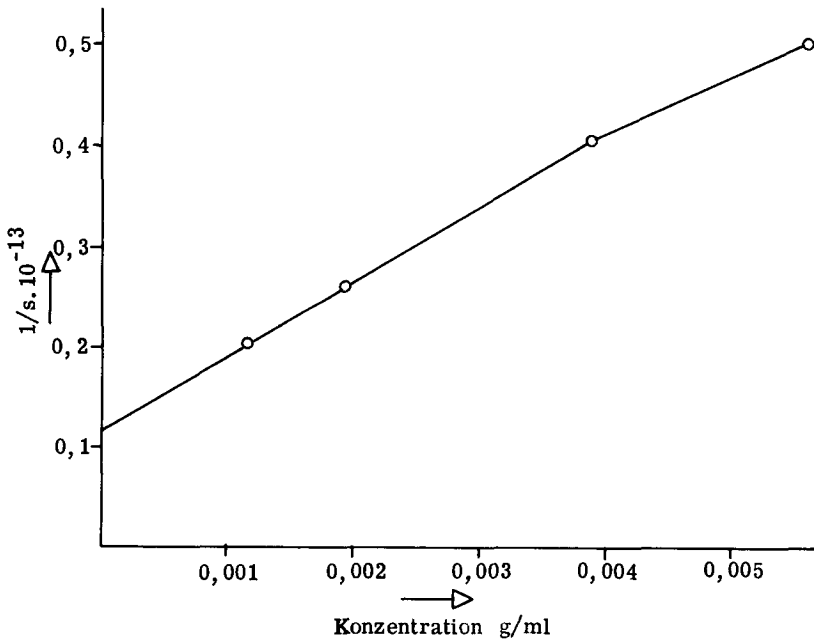


Abb. 9 Sedimentationskoeffizienten von Guaran

2. 323 Messung der Diffusionsgeschwindigkeit

Diffusionsmessungen lassen sich in der Ultrazentrifuge am einfachsten durch Erzeugen einer künstlichen Grenzschicht während des Versuchs vornehmen. Aus ungeklärten Gründen misslingen jedoch alle derartigen Versuche; auch wurde so gearbeitet, dass zunächst bis in die Mitte der Zelle sedimentiert wurde (56 100 U/Min.) und dann vorsichtig auf 2 994 U/Min. abgebremst wurde. Aus der Verbreiterung der Kurven wurde sodann der Diffusionskoeffizient nach der Flächenmethode berechnet.

Die in der Grössenordnung von etwa 5 Minuten liegenden Nullzeit-Korrekturen zeigen, dass bei den Messungen bei den höheren Geschwindigkeiten noch keine wesentliche Diffusion eingetreten sein kann. Die erhaltenen scheinbaren Diffusionskoeffizienten wurden auf unendlich hohe Zeit extrapoliert, um Störungen bei der Gradientenkurve während des Abbremsens auszuschalten. Die erhaltenen Diffusionskoeffizienten sind in Tab. VI zusammengestellt.

Tab. VI Diffusionskoeffizienten von Guaran

Konzentration c g/ml	Diffusionskoeffizient D_c cm^2/sec
0,00500	0,50
0,00410	0,47
0,00220	0,38

Die Messwerte wurden nach

$$D_c = D_0 (1 + k_D \cdot c)$$

auf die Konzentration Null extrapoliert. Es ergaben sich für $D_0 = 0,29 \text{ cm}^2/\text{sec}$ und $k_D = 150 \text{ ml/g}$.

2.324 Berechnung des Molekulargewichtes

Aus Sedimentations- und Diffusionskoeffizient kann nach der Svedberg-Formel

$$\bar{M}_{sD} = \frac{RT \cdot s_0}{D_0 (1 - *Vd)} \quad d = \text{Dichte des Lösungsmittels}$$

das Molekulargewicht berechnet werden, das dem Gewichtsmittel des Molekulargewichtes der untersuchten Substanz nahe verwandt ist. Nimmt man das partielle spezifische Volumen (*V) des Polymeren als gleich mit dem bei Dextran gefundenen an, Granath (26), $*V = 0,611 \text{ ml/g}$, so erhält man

$$\begin{aligned} \bar{M}_{sD} &= \frac{8,303 \cdot 10^7 \cdot 298,2 \cdot 8,7 \cdot 10^{-13}}{0,29 \cdot 10^7 (1 - 0,611 \cdot 1)} \\ &= 1900000 \\ &===== \end{aligned}$$

Der zweite Virialkoeffizient A_2 errechnet sich nach Beckmann (6) über

$$A_2 = \frac{RT (k_s + k_D)}{2 M}$$

zu $5,1 \text{ Atm. ml}^2 \cdot \text{g}^2$. Er liegt für ein gutes Lösungsmittel in der richtigen Grössenordnung bei einem Molekulargewicht von ca. 2 Millionen.

2.4 Stabilität und Verhalten von Galaktomannanen in Lösung

2.41 Viskositätsänderungen in wässriger Lösung

2.411 Viskositätsänderungen beim Stehenlassen der Lösungen

Eine 0,12 proz. Guar- und eine 0,13 proz. Carubinlösung wurden 8 Tage stehen gelassen. In Abständen von 24 Stunden wurde die Viskosität (η_{rel}) mit einem UBBELOHDE-Kapillarviskosimeter (Wasserwert bei $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$: 23,9 sec) gemessen. Aus den gemessenen Durchflusszeiten wurde die spezifische Viskosität (η_{spez}) berechnet. Die Resultate sind aus Abb. 10 ersichtlich. Beim Stehenlassen von Guar- und Carubinlösungen trat ein Viskositätsabfall ein, der bei Guar 23 % und bei Carubin 5 % der Anfangsviskosität betrug. Im weitem war der Abfall bei Carubin über die ganze Beobachtungsdauer gleichmässig, während die Viskosität bei Guar in den ersten 48 Stunden stark zurückging und sich nachher nur noch wenig veränderte.

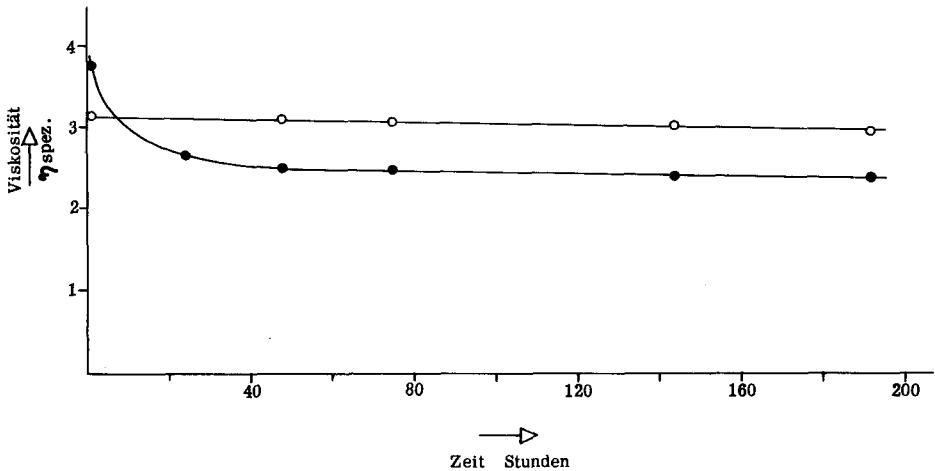


Abb. 10 Abnahme der Viskosität beim Stehenlassen von Galaktomannanlösungen

- Carubin 0,13 proz.
- Guar 0,12 proz.

2.412 Viskositätsänderungen beim Erhitzen von Galaktomannanlösungen

Die Anfangsviskosität (η_{spez}) einer 0,13 proz. Guaranylösung betrug 2,89; die einer 0,15 proz. Carubinlösung 2,94. Je ein Drittel dieser Stammlösungen wurde bei 60, 80 und 100°C während 8 Stunden am Rückfluss erhitzt, wobei nach jeder Stunde die spezifische Viskosität bestimmt wurde. Die Resultate sind aus der Abb. 11 ersichtlich.

Die Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Viskosität zeigten, dass die Viskosität beim Erhitzen bei Guaranylösung und Carubinlösung auf 100°C gleich stark zurückgeht, d. h. nach 6 - 8 Stunden auf ca. 20 % der Anfangsviskosität. Bei 80°C treten deutliche Unterschiede ein, indem Guaranylösung sich als instabiler erweist als Carubinlösung; die Abnahme beträgt nach der gleichen Zeit 60 %, bzw. 20 % bezogen auf die Anfangsviskosität. Bei 60°C verhalten sich beide Galaktomannane ungefähr gleich; d. h. Guaranylösung und Carubinlösung können, ohne dass sich die Viskosität wesentlich ändert, während einigen Stunden auf 50 - 60°C erhitzt werden.

Als Grund für diesen Viskositätsabfall ist eine Spaltung der Mannan-Hauptkette anzunehmen; eine Abspaltung der Galaktose-Seitenäste konnte nicht festgestellt werden. Es wurde versucht, den Abbau durch Erhitzen mit Hilfe der Methode von Lauener und Tomimatsu (38) zu beweisen. Dazu wurden je 100 ml Guaranylösung (470 mg/100 ml Wasser) und Carubinlösung (540 mg/100 ml Wasser) im siedenden Wasserbad während 6 Stunden am Rückfluss erhitzt. Proben wurden zu Beginn, nach 3 Stunden und 6 Stunden entnommen, und das Molekulargewicht unter den üblichen Bedingungen bestimmt. Die Berechnungen und Resultate sind in Tab. VII zusammengestellt. Die Abnahme des Molekulargewichtes ist aus Abb. 12 ersichtlich.

Die Molekulargewichtsbestimmungen an Galaktomannanen nach dem Erhitzen zeigten eine eindeutige Abnahme des Molekulargewichtes bis auf ca. die Hälfte der ursprünglichen Werte. Das bedeutet, dass durchschnittlich pro Molekül eine β (1 \rightarrow 4) glycosidische Bindung zwischen zwei Mannose Bausteinen gespalten wurde. Bollinger und Münzel (9) konnten zeigen, dass sich Natriumalginatlösungen analog verhalten. Die Viskositätsverluste der durch Erhitzen geschädigten Alginatkomplexe kommen durch Depolymerisation der Fadenmoleküle zustande.

2.413 Abnahme der Viskosität bei Zugabe von Alkalihydroxyd

Je 10, 5, 1, 0,5 und 0,1 N Lösungen von Lithium-, Natrium- und Kaliumhydroxyd wurden hergestellt. (Bei Lithiumhydroxyd war die höchste Konzentration eine 5 N Lösung.) Pro Probe wurden 200 ml 0,25 proz. Guaranylösung bzw. Carubinlösung, 25 ml Alkalihydroxyd der oben aufgeführten Normalitäten und Wasser bis 250 ml (Messkolben) vermischt. Die Endkonzentrationen waren somit 1, 0,5, 0,1, 0,05, bzw. 0,01 N Alkalihydroxydlösungen; die der Galaktomannane 0,2 %.

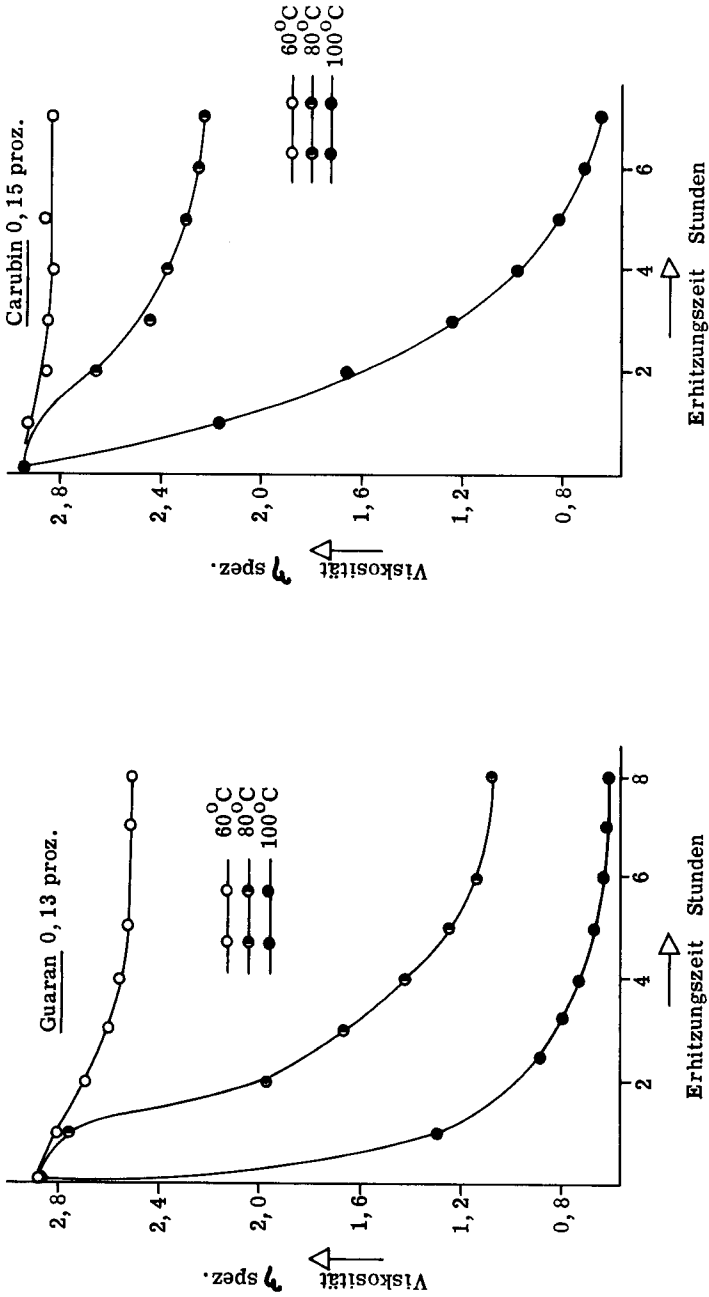


Abb. 11 Viskositätsabnahme von Galaktomannanlösungen beim Erhitzen auf verschiedene Temperaturen

Tab. VII Aenderung des Molekulargewichtes beim Erhitzen von
Guaran- und Carubinlösungen

Produkt	Ansatz mg	Verbrauch 0,03 N Na- thiosulfat ml	entspricht μ M Mannose (aus der) Eichkurve	mg Galakto- mannan ent- sprechend 1 μ M	Molekular- gewicht
Guaran					
nicht erhitzt	47	0,36	0,19	250	250 000
nach 3 Std. bei 100 ⁰	47	0,62	0,32	145	145 000
nach 6 Std. bei 100 ⁰	47	0,76	0,40	120	120 000
Carubin					
nicht erhitzt	54	0,25	0,13	415	415 000
nach 3 Std. bei 100 ⁰	54	0,50	0,26	208	210 000
nach 6 Std. bei 100 ⁰	54	0,55	0,29	187	187 000

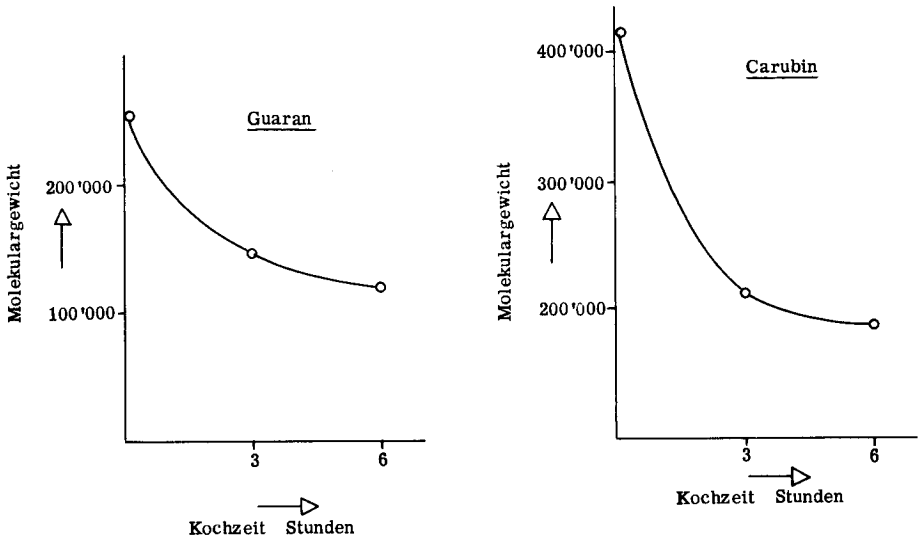


Abb. 12 Aenderungen des Molekulargewichtes beim Erhitzen
von Galaktomannanlösungen

Nach 15 und 72 Stunden Stehenlassen wurde die Viskosität mit dem UBBELOHDE-Kapillarviskosimeter gemessen. Aus den gemessenen Zeiten wurde η_{spez} berechnet und die prozentuale Viskositätsabnahme bezogen auf η_{spez} des reinen Galaktomannans ermittelt. Die Resultate sind aus Abb. 13 ersichtlich.

2.42 Bestimmung der Grenzviskosität von Galaktomannanlösungen

2.421 Allgemeines

Der Begriff der Grenzviskosität oder des STAUDINGER-Index (engl. intrinsic viscosity) wurde von Signer (50) eingeführt und ist definiert als

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \cdot c}$$

$$\begin{aligned} \eta &= \text{Viskosität der Lösung} \\ \eta_0 &= \text{Viskosität des Lösungsmittels} \\ c &= \text{Konzentration der Lösung} \end{aligned}$$

Für bekannte Konzentrationen erhält man aus obiger Gleichung

$$[\eta] = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \cdot c}$$

und durch Umformen

$$[\eta] = 1/c \left(\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \right) = 1/c \left(\frac{\eta}{\eta_0} - 1 \right)$$

Praktisch wird nun so vorgegangen, dass von jedem Präparat für drei verschiedene Konzentrationen die entsprechende Viskosität gemessen wird. Daraus wird nach der letzten Gleichung der STAUDINGER-Index berechnet und graphisch aufgetragen als Funktion der Konzentration. Da diese Werte aber noch die Wechselwirkungsparameter des Gelösten mit dem Lösungsmittel enthalten, muss auf die Konzentration Null extrapoliert werden, um den Beitrag des freien Moleküls zu erhalten.

2.422 Guarán und Carubin

Durch Verdünnen mit Wasser wurden die benötigten Lösungen aus Stammlösungen hergestellt. Die Viskositäten wurden mit einem UBBELOHDE-Kapillarviskosimeter (Wasserwert bei $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$: 23,9 sec) gemessen. Die Elektrolytzusätze wurden fest eingewogen und so berechnet, dass die Lösung die gewünschte Normalität aufwies. Die verwendeten Elektrolyte und die Resultate der durchgeführten Messungen sind in Tab. VIII zusammengestellt.

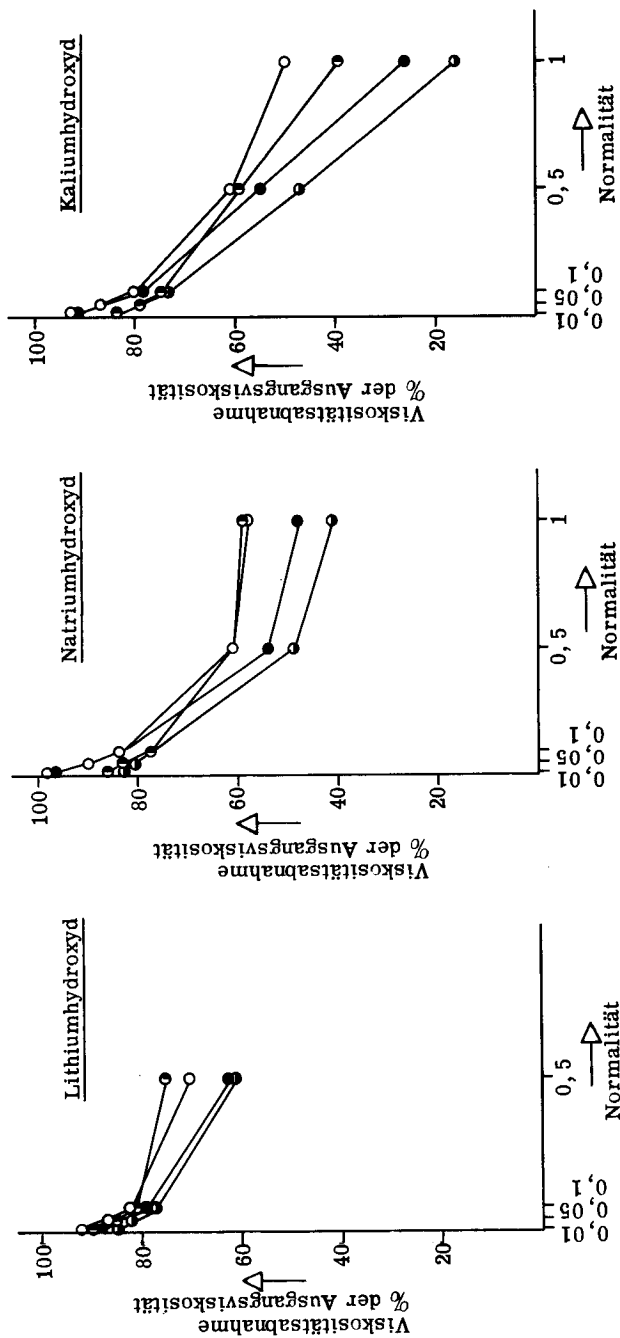


Abb. 13 Abnahme der Viskosität bei Zugabe von Alkalihydroxyden

- — Guaran, nach 15 Std.
- — Carubin, nach 15 Std.
- — Carubin, nach 72 Std.
- — Guaran, nach 72 Std.

Tab. VIII Beeinflussung der Grenzviskosität $[\eta]$ von Guaran und Carubin durch Elektrolyte

Lösungsmittel	Guaran	Carubin		
		kaltwasserlösliche Fraktion	heisswasserlösliche Fraktion	total wasserlösliche Fraktion
	$[\eta]$	$[\eta]$	$[\eta]$	$[\eta]$
Wasser	1400	820	1070	1160
0,1 N LiCl	1320	760	970	1050
0,1 N NaCl	1060	740	890	900
0,1 N KCl	950	700	760	810
0,01 N NaOH	900	950		890
1 N NaOH	350	480		610
0,01 N KOH	880	520		750
1 N KOH	160	220		450

2.423 Enzymatisch behandeltes Guaran

Die in Abschnitt 2.532 hergestellten Guaranpräparate wurden ebenfalls in diese Untersuchung einbezogen. Die Bestimmung der Grenzviskosität und die Berechnung erfolgte analog. Die verwendeten Elektrolyte und die Resultate der durchgeführten Messungen sind in Tab. IX zusammengestellt.

Tab. IX Beeinflussung der Grenzviskosität $[\eta]$ von enzymatisch behandeltem Guaran durch Elektrolyte

Lösungsmittel	Guaran	Guaranlösung "A"	Guaranlösung "B"
		Verhältnis Galaktose / Mannose 1 : 2,6	Verhältnis Galaktose / Mannose 1 : 3,2
	$[\eta]$	$[\eta]$	$[\eta]$
Wasser	1400	1280	780
0,01 N NaOH	900	990	710
1 N NaOH	350	560	510
0,01 N KOH	880	940	640
1 N KOH	160	260	360

2.424 Berechnung der HUGGINS'schen Konstanten

Im Zusammenhang mit der Grenzviskosität wurde die HUGGINS'sche Konstante berechnet. Sie stellt ein Mass für die Güte des Lösungsmittels dar. In guten Lösungsmitteln beträgt sie ca. 0,4 und wächst mit schlechter werdenden Löseeigenschaften stark an.

Praktisch ist es so, dass die HUGGINS'sche Konstante aus der Neigung der gleichen Kurve berechnet werden kann, die zur Ermittlung des STAUDINGER-Indexes führte (vgl. 2.421).

$$\text{tg } \alpha = k_H \cdot [\eta]$$

Die Resultate der Berechnungen der HUGGINS'schen Konstanten sind aus Tab. X ersichtlich.

Tab. X Berechnung der HUGGINS'schen Konstanten von Galaktomannanlösungen

Lösungsmittel	Guaran		Carubin	
	$[\eta]$	k_H	$[\eta]$	k_H
Wasser	1400	0,41	1160	0,85
0,01 N NaOH	900	0,2	890	0,9
1 N NaOH	350	9,5	610	3,5
0,01 N KOH	880	1,4	750	1,1
1 N KOH	160	13,3	450	7,1

2.43 Komplexbildung mit Erdalkalihydroxyden, Aluminium, Zirkonium und Germanium

Deuel und Neukom (18) wiesen darauf hin, dass Galaktomannane besonders mit Kupfer- und Borationen unlösliche Komplexe zu bilden vermögen. Es sollte untersucht werden, ob Calcium, Strontium und Barium, sowie Aluminium, Zirkonium und Germanium unlösliche Komplexe bilden.

2.431 Komplexbildung mit Erdalkalihydroxyden

Wegen der schlechten Löslichkeit der Hydroxyde in Wasser wurden von Calcium-, Strontium- und Bariumhydroxyd nur zwei Konzentrationen gewählt: gesättigte und 0,04 N Lösungen.

Die gesättigten Lösungen wurden durch Schütteln eines Ueberschusses von Calcium-, Strontium- und Bariumhydroxyd mit Wasser während 24 Stunden hergestellt. Nach dem Abfiltrieren wurde die Konzentration mit 0,1 N Salzsäure bestimmt.

Ca(OH)_2	gesättigt	0,04 N
Sr(OH)_2	gesättigt	0,13 N
Ba(OH)_2	gesättigt	0,40 N

5 ml 0,6 proz. Guarán-, bzw. Carubinlösung wurden mit 1, 2, 3, 4 und 5 ml gesättigter Hydroxydlösung versetzt und mit Wasser auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Endkonzentration des Galaktomannans betrug somit 0,3 %. - Guarán und Carubin konnten nur mit gesättigter Bariumhydroxydlösung ausgefällt werden. Als niedrigste Konzentration, die gerade noch auszuflocken vermag, wurde 10 mÄq. Ba(OH)_2 pro 1 mÄq. Galaktomannan errechnet. Meier (38 A) gelang es, ein Holz-Glucomannan als unlöslichen Bariumkomplex auszufällen.

0,04 N Lösungen von Calcium-, Strontium- und Bariumhydroxyd konnten bei Guarán und Carubin kein Ausflocken bewirken.

2.432 Komplexbildung mit Aluminium, Zirkonium und Germanium

Von Aluminiumchlorid, Kalium-Aluminiumsulfat und Zirkonoxychlorid wurden 1 N, von Germaniumoxyd 0,05 N Lösungen hergestellt. 0,3 proz. Lösungen (5 ml) von Guarán und Carubin wurden mit den entsprechenden Reagentien versetzt.

Einzig Zirkonoxychlorid bildete mit den Galaktomannanlösungen einen Komplex, der ausflockte. Die Grenzkonzentration liegt wesentlich tiefer als bei Barium: ca. 10^{-2} mÄq. Zirkonoxychlorid pro 1 mÄq. Galaktomannan. Im Gegensatz zu Bariumhydroxyd tritt die Ausflockung bei Zirkonoxychlorid im sauren Milieu ein. Mit Germaniumsäure und Aluminiumchlorid konnte keine Ausflockung erzielt werden.

2.44 Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit von Galaktomannanlösungen nach Zugabe von Alkalihydroxyden

Zur weitem Abklärung des Verhaltens von Galaktomannanen in alkalischer Lösung wurden die Sedimentationsgeschwindigkeiten von Guarán in Kalium- und Natriumhydroxydlösungen verschiedener Normalität bestimmt. Das Vorgehen und die Berechnungen sind bereits in 2.33 beschrieben.

Die Resultate sind in Tab. XI und XII zusammengestellt. Die Ausgangskonzentrationen wurden mit Anthron (40) spektrophotometrisch bestimmt. Alle andern Konzentrationen wurden durch Verdünnen nach Gewicht hergestellt. Aus der graphischen Auftragung (Abb. 14) errechnet sich für 0,1 N KOH als Lösungsmittel ein $s_0 = 8,2$

Svedberg und für 0,8 N NaOH ein $s_o = 7,7$ Svedberg (1 Svedberg = 10^{-13} sec⁻¹). Der Sedimentationskoeffizient von Guarán in Wasser beträgt vergleichsweise 8,7 Svedberg.

Tab. XI Sedimentationskoeffizienten von Guarán in 0,1 N KOH

Konzentration c g/ml	Sedimentationskoeffizienten s_c Svedberg
0,0098	1,29
0,0049	1,90
0,0035	2,25
0,0022	3,06
0,0011	4,45

Tab. XII Sedimentationskoeffizienten von Guarán in 0,8 N NaOH

Konzentration c g/ml	Sedimentationskoeffizienten s_c Svedberg
0,0057	1,72
0,0042	1,89
0,0033	2,20
0,0022	2,61
0,0013	3,51

2.45 Messung des optischen Drehvermögens von verschiedenen Galaktomannanen in Gegenwart von Elektrolyten

Das optische Drehvermögen von Polysacchariden kann durch Komplexbildung und Zusätze von Alkalien z. T. stark verändert werden. Diese Drehungsänderungen werden auf Aenderungen der Konformation zurückgeführt. Diese relativ einfache Methode zur Untersuchung von Konformationsänderungen wurde auch auf Galaktomannane angewandt. Dabei wurden zwei Ziele verfolgt: einerseits sollte der Einfluss der Galaktose-Seitenäste auf die Drehung bestimmt und andererseits Aenderungen in der Konformation der Galaktomannane erfasst werden.

Nachfolgende Galaktomannane wurden in Wasser gelöst und 1 Stunde bei 35000 x g zentrifugiert:

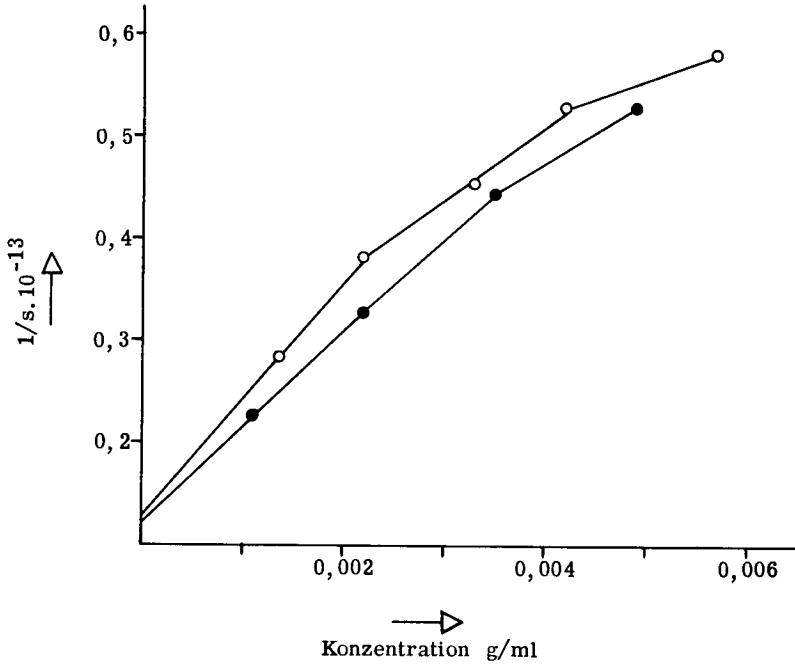


Abb. 14 Sedimentationskoeffizienten von Guarana in Kalium- und Natriumhydroxyd

○—○—○ 0,8 N NaOH
●—●—● 0,1 N KOH

Galaktomannan aus Guarana
Carubin
Luzerne (*Medicago sativa* L.)
Griechisch Heu (*Trigonella foenum graecum* L.)
Tara (*Casalpinia spinosa*)

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte spektrophotometrisch mit Anthron (40). Das optische Drehvermögen der Lösungen dieser Galaktomannane wurde sowohl in Wasser als auch in Kaliumhydroxyd steigender Normalität mit einem ZEISS-WINKEL Polarimeter gemessen und als $[\alpha]_D^{20}$ berechnet. Die Resultate sind in Tab. XIII zusammengestellt.

Tab. XIII Messung des optischen Drehvermögens von Galaktomannanen

Lösungsmittel	Galaktomannane, mit zugehörigem Verhältnis Galaktose/Mannose						
	Luzerne 1 : 1	Trigonella foenum graecum 1 : 1	Guaran 1 : 2	Tara 1 : 3	Carubin		
					kaltwasser- lösliche Fraktion 5 : 6	heisswasser- lösliche Fraktion 1 : 3,5	total was- serlösli- che Frakt. 1 : 4
Wasser	104°	96°	77°	40°	19°	4°	5°
0,01 N KOH	85°	58°	65°	-	17°	2°	-
0,1 N KOH	76°	37°	41°	6°	15°	-	-
1 N KOH	47°	44°	28°	4°	12°	-	-
5 N KOH	47°	44°	13°	-26°	9°	geliert	geliert
10 N KOH	82°	29°	6°	-29°	-11°	geflockt	geflockt

Im weiteren wurde das optische Drehvermögen von enzymatisch behandeltem Guaran, vgl. dazu Abschnitt 2.532, untersucht. Die Bedingungen waren dabei die gleichen wie im vorhergehenden Abschnitt. Die Resultate sind in Tab. XIV zusammengestellt.

Tab. XIV Messung des optischen Drehvermögens von enzymatisch behandeltem Guaran in Gegenwart von Natriumhydroxyd

Lösungsmittel	$[\alpha]_D^{20}$	
	Guaranlösung "A" Verhältnis Galaktose / Mannose 1 : 2,6	Guaranlösung "B" Verhältnis Galaktose / Mannose 1 : 3,2
Wasser	66°	53°
0,01 N NaOH	62°	48°
0,1 N NaOH	52°	37°
1 N NaOH	46°	26°
5 N NaOH	34°	19°

Abb. 15 zeigt die Abhängigkeit der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{20}$ vom Verhältnis Galaktose/Mannose. Der Verlauf der Kurve (vgl. Tab. XIII und XIV) zeigt, dass das

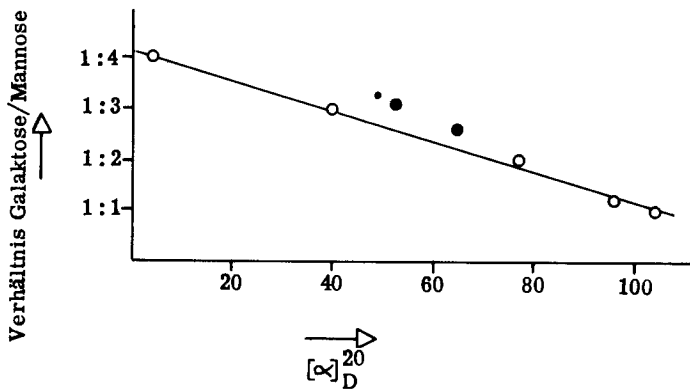


Abb. 15 Abhängigkeit des optischen Drehvermögens bei Galaktomannanen vom Verhältnis Galaktose/Mannose

- Galaktomannane
- Enzymatisch behandeltes Guarana

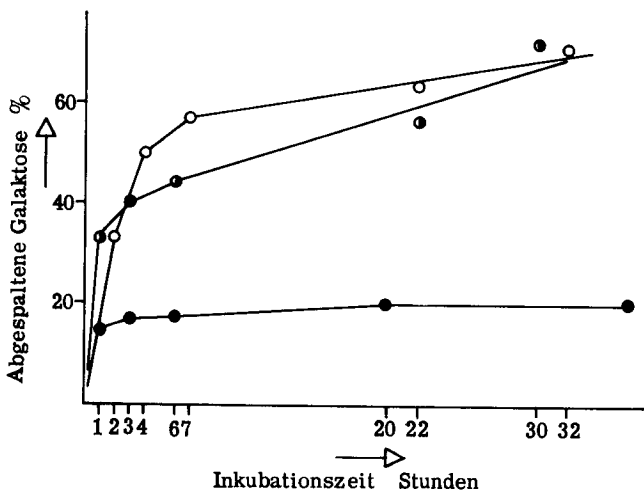


Abb. 16 Abspaltung von Galaktose aus Guarana und Carubin durch α -Galaktosidase

- heisswasserlösliche Carubinfraktion
- kaltwasserlösliche Carubinfraktion
- Guarana

optische Drehvermögen ziemlich stark vom Galaktosegehalt abhängt. Die Messung des optischen Drehvermögens kann direkt zur approximativen Bestimmung des Verhältnisses Galaktose/Mannose verwendet werden und ist somit eine einfache und praktische Methode zur Charakterisierung von Galaktomannanen. Interessanterweise liegen die Werte des optischen Drehvermögens des enzymatisch behandelten Guarans etwas höher (vgl. Abb. 15).

2.5 Enzymatische Abspaltung von Galaktose aus Galaktomannanen

Für das Verhalten und die Eigenschaften der Galaktomannane in Lösung spielen sicher die Galaktose-Seitenäste eine wichtige Rolle. Um den Einfluss dieser Galaktose-Seitengruppen zu studieren, wurde versucht, bei Guarán mit einem geeigneten Enzym Galaktose abzuspalten, um Präparate herzustellen, die sich nur in ihrem Verhältnis Galaktose/Mannose, nicht aber in ihrer Kettenlänge voneinander unterscheiden. Eine geeignete α -Galaktosidase konnte aus grünen Kaffeebohnen nach der Vorschrift von Courtois et al. (13) extrahiert werden.

2.51 Extraktion von α -Galaktosidase aus grünen Kaffeebohnen

968 g grüne Kaffeebohnen (SANTOS) wurden fein gemahlen. Zur Entfernung der Farbstoffe und Fette wurde drei Tage mit 2400 ml toluolgesättigtem Wasser auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Die filtrierte Lösung wurde mit 250 ml 2 proz. Tanninlösung versetzt und das Enzym als Tanninkomplex gefällt. Der zentrifugierte Niederschlag wurde mit Aceton gewaschen, bis kein Tannin mehr nachgewiesen werden konnte. Die Ausbeute des bei Zimmertemperatur im Vakuum getrockneten Enzympräparates betrug 6,8 g (0,7 % bezogen auf das Ausgangsmaterial).

2.52 Bestimmung der Temperatur- und pH-Optima der extrahierten α -Galaktosidase

Proben von je 5 mg α -Galaktosidase, in 1 ml McILVAINE Puffer pH 5 gelöst, wurden zu 4 ml 2 proz. Melibioselösung (FLUKA A.G., Buchs) gegeben und bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Die papierchromatographische Bestimmung der Galaktose (qualitativ) in den Reaktionslösungen ergab ein Mass für die Aktivität des Enzyms.

Temperaturen: 20, 37 und 50°C
 pH-Werte : 4, 5 und 6

Die grösste α -Galaktose Aktivität wurde bei pH 5 und 37°C gefunden. Bei allen folgenden enzymatischen Versuchen wurde daher unter diesen Reaktionsbedingungen gearbeitet.

2. 53 Einwirkung von α -Galaktosidase auf verschiedene Galaktomannane

2. 531 Bestimmung der Aktivität bei einmaliger Enzymzugabe

Die Versuche wurden mit den in Abschnitt 2. 45 aufgezählten Galaktomannanen ausgeführt, wobei Guarán und Carubin etwas eingehender untersucht wurden.

Es wurden 0, 5 proz. Lösungen von Guarán und Carubin verwendet. Das Enzym wurde in Natriumphosphat Puffer (pH 5) gelöst (1 mg Enzym pro 2 ml Puffer) und filtriert. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C inkubiert. Die nach bestimmten Zeiten entnommenen Proben wurden durch Erhitzen auf 100°C während 10 Minuten inaktiviert. Die Bestimmung der Galaktose mit Anthron (40) im Fällalkohol ergab die in Tab. XV aufgeführten Resultate.

Tab. XV Abspaltung von Galaktose aus Guarán und Carubin
durch einmalige Enzymzugabe

Reaktions- zeit	Abgespaltene Menge Galaktose, bezogen auf die theoretisch abspaltbare Menge (in %)		
	Guaran	Carubin	
		heisswasserlösliche Fraktion	kaltwasserlösliche Fraktion
1	14,6		33
2		33	
3	16,5		40
4		50	
6	17,2		44
7		57	
20	20,5		
22		63	56
30			72
32		71	
48	19,9		

Der Verlauf der enzymatischen Abspaltung von Galaktose ist aus Abb. 16 ersichtlich.

Je 200 ml 0,5 proz. Lösungen der Galaktomannane aus Griechisch Heu, Luzerne und Tara wurden mit je 20 mg Enzym, das in 40 ml Natriumphosphat Puffer (pH 5) gelöst war, während 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die quantitative Bestimmung der Galaktose im Fällalkohol ergab die in Tab. XVI aufgeführten Resultate.

Tab. XVI Abspaltung von Galaktose aus verschiedenen Galaktomannanen

Galaktomannan	Verhältnis Galaktose/Mannose vor der enzymatischen Behandlung	Abgespaltene Menge Galaktose (bezogen auf die theoretisch abspaltbare Menge)	Verhältnis Galaktose/Mannose nach der enzymatischen Behandlung
Luzerne	1 : 1	25 %	1 : 1,3
Tara	1 : 3	20 %	1 : 4
Griechisch Heu	1 : 1	19 %	1 : 1,2

2.532 Bestimmung der Aktivität bei zweimaliger Enzymzugabe

Um den Wirkungsgrad des verwendeten Enzyms zu verbessern und um Guarpräparate zu erhalten, deren Verhältnis Galaktose/Mannose sich deutlicher voneinander unterschieden, wurde nach der ersten Enzymzugabe inaktiviert und noch ein zweites Mal Enzym zugegeben.

900 ml 0,5 proz. Guarauflösung wurden mit 90 mg Enzym, gelöst in 100 ml Natriumphosphat Puffer (pH 5), bei 37°C während 24 Stunden inkubiert. 300 ml dieser Lösung wurden 15 Minuten bei 100°C inaktiviert. Davon wurden 50 ml in Alkohol gefällt und im Fällalkohol die Galaktose quantitativ bestimmt (vgl. Tab. XVII). Die restlichen 250 ml Lösung wurden zur Entfernung der abgespaltenen Galaktose und der Elektrolyte dialysiert (Guarauflösung "A").

Zu den verbleibenden 600 ml Guarauflösung wurden erneut 60 mg Enzym, gelöst in 50 ml Natriumphosphat Puffer (pH 5), zugegeben und bei 37°C weitere 24 Stunden inkubiert. Die abgespaltene Galaktose wurde wie oben bestimmt (vgl. Tab. XVII). Die Lösung wurde wieder dialysiert und wird im folgenden als Guarauflösung "B" bezeichnet. Von dieser Lösung wurde sowohl das optische Drehvermögen (vgl. Tab. XIV) als auch die Grenzviskosität (vgl. Tab. IX) bestimmt.

Tab. XVII Abspaltung von Galaktose aus Guaran durch zweimalige Enzymzugabe

Guaran- lösung	Reaktions- zeit Std.	Abgespaltene Menge Galaktose bezogen auf die theoretisch ab- spaltbare Menge	Verhältnis Galaktose/Man- nose im gefällten Galakto- mannan
	0		1 : 2
"A"	24	22 %	1 : 2,6
"B"	48	38 %	1 : 3,2

3. DISKUSSION

Ein sehr wichtiger Unterschied in den Eigenschaften der beiden Galaktomannane, Guaran und Carubin, liegt in der Löslichkeit. Guaran ist grösstenteils kaltwasserlöslich, während sich Carubin erst in heissem Wasser vollständig löst. Die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit gab die Möglichkeit einer Fraktionierung, insbesondere von Carubin (vgl. Tab. III). Dabei lag es nahe anzunehmen, dass sich die einzelnen Fraktionen in erster Linie im Verhältnis Galaktose/Mannose und im Molekulargewicht unterscheiden. Dies war auch der Grund für eine eingehende Untersuchung der Molekulargewichte. Daher wurden zunächst verschiedene Methoden der Molekulargewichtsbestimmung auf die Galaktomannane angewandt. Mit diesen Methoden konnte auch die Stabilität von Galaktomannanlösungen beim Erhitzen (vgl. Tab. VII), sowie auch das Verhalten in alkalischer Lösung untersucht werden.

3.1 Bestimmung der Molekulargewichte

Der Begriff Molekulargewicht ist nur solange als definierte Grösse richtig, als alle Moleküle der entsprechenden Verbindung das gleiche Molekulargewicht besitzen. Sobald sich aber eine Verbindung aus mehr als nur einer Molekülart zusammensetzt, muss der Begriff Molekulargewicht durch den Mittelwert des Molekulargewichtes ersetzt werden. Makromolekulare Substanzen liegen in ihrem Ausgangszustand meist als polymolekulare Verbindungen vor; für Naturstoffe gilt diese Tatsache in noch weit stärkerem Masse. Dieser wichtige Zustand wird durch die Verteilungsfunktion charakterisiert. Aus der Verteilungsfunktion lässt sich auch der Mittelwert des Molekulargewichtes der Ausgangssubstanz errechnen. Man unterscheidet nun verschiedene Mittelwerte: das Zahlen- und das Gewichtsmittel.

Das Zahlenmittel (englisch: number average molecular weight) \bar{M}_n . Der Gewichtsanteil w_i einer makromolekularen Substanz mit dem Molgewicht M_i ist

$$w_i = n_i \cdot M_i$$

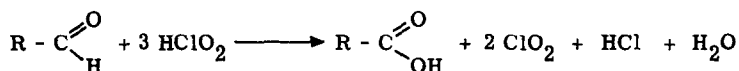
wobei n_i die Anzahl Moleküle der Substanz mit dem Molgewicht M_i bedeutet. Das Zahlenmittel des Molekulargewichtes der makromolekularen Substanz \bar{M}_n errechnet sich aus den Gewichtsanteilen w_i , bzw. Molzahlen n_i der Einzelmolekulargewichte nach der Formel

$$\bar{M}_n = \frac{\sum w_i}{\sum n_i} \quad \text{oder} \quad \frac{\sum n_i \cdot M_i}{\sum n_i}$$

Das Zahlenmittel stellt also einen linearen Mittelwert dar.

Der Zahlenmittelwert kann direkt experimentell bestimmt werden, ohne Ermittlung der Verteilungsfunktion, wenn es gelingt, eine charakteristische Endgruppe genau zu bestimmen.

Die erst kürzlich publizierte Methode von Launer und Tomimatsu (38) konnte nach einigen Modifikationen erfolgreich für die Bestimmung der Molekulargewichte der Galaktomannane verwendet werden. Bei dieser Methode wird die endständige Aldehydgruppe mit Natriumchlorit zur Säuregruppe oxydiert:



Die von Launer und Tomimatsu (38) beschriebenen Reaktionsbedingungen waren für unsern Fall ungeeignet, da infolge der hohen Temperatur (50°C) schon nach drei Stunden eine gleichmässige Zunahme der Aldehydgruppen feststellbar war, d. h. das Galaktomannan-Molekül wurde gespalten. Bei einer Reaktionstemperatur von 25°C konnte diese Spaltung verhindert werden, d. h. zwischen acht und elf Stunden Reaktionszeit war keine Zunahme der Aldehydgruppen festzustellen.

Mit Hilfe dieser neuen Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes war es nun auch möglich, eventuelle Unterschiede in den Molekulargewichten der kaltwasserlöslichen Fraktionen von Guar und Carubin zu ermitteln. Der bei Zimmertemperatur lösliche Anteil des Carubins besitzt demnach ein Molekulargewicht von 150 000, der kaltwasserlösliche Anteil des Guarans dagegen ein solches von 250 000 (vgl. Tab. IV). Da das Verhältnis Galaktose/Mannose dieser beiden kaltwasserlöslichen Fraktionen ungefähr gleich ist (vgl. Tab. III), ist zu erwarten, dass die kaltwasserlösliche Fraktion des Carubins eine geringere Viskosität besitzt als die entsprechende Fraktion des Guarans. Auffallend ist, dass die Viskosität des Carubins heissgelöst trotz des höheren Molekulargewichtes geringer ist als diejenige von Guar. Es scheint, dass der geringere Gehalt an Galaktose-Seitenästen für diesen Effekt verantwortlich ist. Die in Tab. IX angegebenen Werte für die Viskosität von enzymatisch behandeltem Guar bestätigen diese Annahme.

Der Gewichts- oder Massenmittelwert (Englisch: weight average molecular weight) \bar{M}_w ist durch die Gleichung definiert:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_i \cdot M_i^2}{\sum n_i \cdot M_i}$$

wobei n_i wiederum die Anzahl Moleküle der Substanz mit dem Molekulargewicht M_i

bedeutet. Beim Gewichtsmittelwert wird der Anteil jedes Molekulargewichtes gegenüber dem Zahlenmittelwert noch mit dem jeweiligen Molekulargewicht multipliziert. Jedes Molekül wird also entsprechend seiner Masse gewertet, sodass die Moleküle mit höherem Polymerisationsgrad weit stärker ins Gewicht fallen als die mit niedrigerem, d. h. die Resultate der beiden Methoden differieren umso stärker, je polymolekularer die Verbindung ist. Bei polymolekularen Gemischen, die einen grossen Anteil an Gliedern mit hohem Polymerisationsgrad besitzen, kann nur der Gewichtsmittelwert einen einigermaßen dem effektiven Molekulargewicht entsprechenden Wert liefern.

Die Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge erfasst mit grosser Näherung den Gewichtschnitt einer makromolekularen Substanz. Wird diese in einem Lösungsmittel gelöst, das eine andere, vom makromolekularen Stoff möglichst stark abweichende Dichte besitzt, so muss sich beim Stehenlassen eine langsame Entmischung einstellen, der die Brown'sche Bewegung der Moleküle entgegenwirkt.

Die Molekulargewichte wurden lediglich für Guaran nach den beiden Methoden bestimmt, während das Molekulargewicht von Carubin nur durch Bestimmung der reduzierenden Endgruppen gemessen wurde. Der Zahlenmittelwert für Guaran beträgt 250 000, der Gewichtsmittelwert dagegen 1 900 000. Boggs (8) fand für das Molekulargewicht von Guaran einen Wert von 220 000. Aus den Angaben, die zur Verfügung stehen, geht leider nicht hervor, ob es sich dabei um einen Gewichts- oder Zahlenmittelwert handelt. Der Zahlenmittelwert des Molekulargewichtes für die total-wasserlösliche Fraktion des Carubins beträgt 300 000. Kubal und Galen (36) bestimmten das mittlere Molekulargewicht von Carubin mit der Ultrazentrifuge zu 310 000. Es dürfte sich dabei um die total-wasserlösliche Fraktion des Carubins gehandelt haben.

Beim Vergleich der beiden Molekulargewichte von Carubin, Zahlen- und Gewichtsmittelwert, fällt auf, dass sie ausserordentlich gut übereinstimmen. Die Vermutung läge daher nahe, dass Carubin ein paucimolekulares Gemisch darstellt, d. h. ein Gemisch mit nur sehr wenigen verschiedenen Molekülarten. Dagegen spricht aber die Fraktionierung des Carubins (vgl. Tab. III), die auf eine heterogene Zusammensetzung hinweist. Die gefundene Diskrepanz der beiden Molekulargewichte beim Guaran deutet ebenfalls auf ein sehr polymolekulares Gebilde hin. Zur genauen Abklärung der Polymolekularität sind aber weitere Untersuchungen notwendig.

Aus dem Zahlenmittelwert des Molekulargewichtes von Guaran ergibt sich für die Mannankette ein Polymerisationsgrad von ca. 900, für Carubin dagegen ein Wert von 1500 Anhydromannose-Einheiten. Demnach sollte bei gleicher Molekülgestalt die Viskosität des Carubins bedeutend höher liegen, tatsächlich ist aber gerade das Gegenteil der Fall.

3.2 Enzymatische Abspaltung von Galaktose aus Galaktomannanen

Für das verschiedene Verhalten der einzelnen Galaktomannane in Lösung ist neben dem Polymerisationsgrad der Hauptkette der Gehalt an Galaktose-Seitenästen massgebend. Um nun deren Einfluss auf die Eigenschaften zu studieren, wurden durch Abspalten von Galaktose aus Guaran Präparate hergestellt, die sich nur in ihrem Verhältnis Galaktose/Mannose voneinander unterschieden, nicht aber in der Kettenlänge.

Die Galaktose-Seitenäste sind $\alpha(1 \rightarrow 6)$ glycosidisch gebunden. Die Abspaltung der Galaktose konnte daher nur mit einer α -Galaktosidase erfolgen.

α -Galaktosidasen können aus verschiedenen Materialien gewonnen werden. Bierry (7) extrahierte bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts eine α -Galaktosidase aus der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*). Auch gewisse Arten von Insekten enthalten α -Galaktosidasen, Koike (35). In Pflanzen sind α -Galaktosidasen sehr verbreitet. So wurde eine α -Galaktosidase von Neuberger (41) in Mandelemulsin, von Helferich und Vorsatz (29) in grünen Kaffeebohnen und von Weidenhagen und Renner (55) in Gersten-Malz gefunden. Die grösste Verbreitung findet α -Galaktosidase wohl in Mikroorganismen. Bau (5) und Fischer und Lindner (25) fanden zum ersten Mal eine α -Galaktosidase in Bierhefe. Wie die Arbeiten von Adams et al. (1) zeigten, fehlt die α -Galaktosidase in Bäckereihefe dagegen vollständig. Verschiedene Autoren extrahierten α -Galaktosidasen aus Pilzen, so z. B. Hofmann (31) aus *Aspergillus niger* und Weidenhagen und Renner (55) aus *Aspergillus oryzae*.

Deuel et al. (20) untersuchten den enzymatischen Abbau von Carubin. Das dabei verwendete Enzym HELISOL (Schweiz. Fermentfabrik A. G., Basel) enthält neben β -Mannanase und α -Galaktosidase noch andere Enzyme, z. B. Pektinase, Cellulase und Amylase. Durch geeignete Vorbehandlung des Enzympräparates gelang es, die β -Mannanase zu inaktivieren, ohne jedoch die Aktivität der α -Galaktosidase zu beeinträchtigen.

Für die hier beabsichtigten enzymatischen Arbeiten wurde die kürzlich von Courtois et al. (13) publizierte Methode zur Gewinnung einer α -Galaktosidase aus grünen Kaffeebohnen verwendet. Courtois et al. (13) zeigten, dass das extrahierte Enzymgemisch α - und β -Galaktosidase und α -Mannanase Aktivität besitzt. Petek und Dong (45) versuchten kürzlich, die α -Galaktosidase aus Kaffeebohnen von den übrigen mitextrahierten Glycosidasen zu trennen und zu reinigen. Dabei machten sie die interessante Feststellung, dass das Enzymgemisch zwei verschiedene α -Galaktosidasen enthielt, die sich deutlich in ihrem K_s -Wert, dem pH-Optimum und vor allem in ihrer Aktivität unterschieden (vgl. später).

Die Einwirkung von α -Galaktosidase aus Kaffeebohnen ergab nun bei Guaran eine selektive Abspaltung von Galaktose. Die dabei beobachtete geringe Viskositätsabnahme (vgl. Tab. IX) wird wahrscheinlich durch den geringeren Galaktosegehalt des behandelten Guarans bewirkt und nicht durch eine Spaltung der Mannan-Hauptkette. Interessanterweise wurde kein reines Mannan erhalten, sondern wieder ein Galaktomannan, das wohl galaktoseärmer war als das Ausgangsmaterial, aber immer noch einen ansehnlichen Teil der ursprünglichen Galaktose-Seitenäste enthielt. Nach 24-stündiger Enzymeinwirkung wurde ein Verhältnis Galaktose/Mannose von 1 : 2,6 bestimmt, die abgespaltene Galaktose entspricht nur ungefähr 20 % der theoretisch abspaltbaren Menge Galaktose. Die Untersuchungen wurden in der Folge auf weitere Galaktomannane ausgedehnt, so auf Galaktomannane aus Luzerne (*Medicago sativa*), Griechisch Heu (*Trigonella foenum graecum*) und Tara (*Caesalpinia spinosa*). Die abgespaltene Menge Galaktose betrug bei diesen drei Galaktomannanen ebenfalls rund 20 %, entspricht also ungefähr dem bei Guaran gefundenen Wert. Demgegenüber verhielt sich Carubin ganz anders; hier konnten merkwürdigerweise 70 % der theoretisch abspaltbaren Menge Galaktose abgespalten werden. Eine unvollständige Abspaltung von Galaktose aus Galaktomannanen (Luzernesamen) ist auch von Courtois et al. (13) beschrieben worden.

Es ist zur Zeit noch nicht ersichtlich, warum das Enzym die Galaktose-Seitenäste nicht vollständig abzuspalten vermag. Verschiedene Gründe können dafür angeführt werden:

(A) Einmal wäre es möglich, dass das Enzym auch als Transglycosidase wirken kann. Tatsächlich konnten Courtois und Petek (12) am Modell des α -Phenyl-D-galaktosids nachweisen, dass die α -Galaktosidase aus dem α -Phenyl-D-galaktosid Galaktose abspaltet und diese mit D-Mannose verknüpft unter Bildung von epi-Melibiose (α -D-Galaktopyranosido-(1 \rightarrow 6)-mannopyranosid). Ähnliche Feststellungen mit andern Substraten wurden früher auch von Anagnostopoulos et al. (2) gemacht. Einer neueren Arbeit von Courtois und Percheron (15) ist zu entnehmen, dass die aus keimenden Griechisch Heu Samen extrahierte α -Galaktosidase mit einem pH-Optimum von 4,6 das Galaktomannan derselben nur teilweise angreift. Das Enzym weist ausserdem eine Transferase-Aktivität für die α -D-Galaktopyranosyl-Gruppe auf, wobei Uebertragung auf hydroxylierte Akzeptoren erfolgt.

(B) Ein zweiter möglicher Grund für die unvollständige Abspaltung der Galaktose wäre eine irreversible Interaktion zwischen Enzym und Substrat, wodurch im Verlauf der Reaktion das Enzym blockiert würde. Durch wiederholte Enzymzugaben gelang es vorerst nicht, zusätzliche Mengen Galaktose abzuspalten. Erst durch Inaktivieren des Enzyms vor jeder Enzymzugabe trat eine deutliche Verbesserung der

Aktivität ein, indem jetzt bei der zweiten Enzymzugabe nochmals ca. 20 % Galaktose abgespalten werden konnten. Courtois (14) vertrat ebenfalls die Auffassung, dass die α -Galaktosidase eine so grosse Affinität zum Substrat hat, dass es fast unmöglich ist, das Enzym nachträglich wieder abzuspalten. Daher versuchte er durch mehrmalige Einwirkung von α -Galaktosidase auf das Luzerne-Galaktomannan mehr Galaktose abzuspalten (13). Nach zweimaliger Enzymzugabe betrug das Verhältnis Galaktose/Mannose 1 : 3,6, was 56 % der theoretisch abspaltbaren Menge Galaktose entspricht. Trotz weiterer Zugaben und längerer Inkubationszeit trat keine weitere Abspaltung mehr ein. Dagegen konnten Petek und Dong (45) das aus grünen Kaffeebohnen extrahierte Enzymgemisch auftrennen und zwei verschiedene α -Galaktosidasen isolieren. Die aktivere der beiden α -Galaktosidasen vermochte aus dem mehrfach untersuchten Galaktomannan aus Luzerne bei einer einmaligen Enzymzugabe 83 % der theoretisch abspaltbaren Menge Galaktose abzuspalten. Mit einer derart gereinigten und hochaktiven α -Galaktosidase sollte es möglich sein, aus Guarán, insbesondere aber aus Carubin, ausserordentlich galaktosearme Galaktomannan- oder vielleicht sogar reine Mannanpräparate herzustellen.

(C) Ein weiterer Grund für die unvollständige Abspaltung der Galaktose-Seitenäste, vor allem aber für den beobachteten Unterschied zwischen Guarán und Carubin, könnte in einer verschiedenen Konstitution der beiden Galaktomannane liegen. Whistler et al. (56) konnten aus sauren und enzymatischen Hydrolysaten verschiedene kristalline Oligosaccharide isolieren. Auf Grund der Struktur dieser Oligosaccharide wurde angenommen, dass die Hauptkette aus $\beta(1 \rightarrow 4)$ gebundenen Mannoseeinheiten besteht, mit $\alpha(1 \rightarrow 6)$ gebundenen einzelnen Galaktose-Seitenästen. Calamari (10) dagegen konnte papierchromatographisch eine Digalactosyl-mannobiose in einem Guarán Hydrolysat nachweisen. Diese Beobachtung lässt sich mit der von Whistler et al. (56) postulierten Struktur nicht vereinbaren, da bekanntlich nur jede zweite Mannose einen Galaktose-Seitenast trägt. Die Röntgenuntersuchungen von Palmer und Ballantyne (43) lassen aber die vorgeschlagene Struktur als ziemlich gesichert erscheinen. Analoge Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur des Carubins wurden von Smith (51) und Hirst und Jones (30) durchgeführt. Die aus den Methylierungsprodukten und Periodat-Oxydationen gewonnenen Ergebnisse weisen auf eine dem Guarán entsprechende Struktur hin, mit dem einzigen Unterschied, dass das Verhältnis Galaktose/Mannose verschieden ist. Es wäre aber dennoch denkbar, dass zwischen Guarán und Carubin geringfügige, strukturelle Unterschiede bestehen, die mit den bisherigen Methoden nicht erfasst werden konnten und für das unterschiedliche Verhalten von Guarán und Carubin verantwortlich sind.

3.3 Verhalten der Galaktomannane im alkalischen Gebiet

Polysaccharide sind im allgemeinen gegenüber Säuren viel labiler als gegenüber Basen. Erst bei erhöhter Temperatur kann im alkalischen Gebiet ein langsamer Kettenabbau beobachtet werden (57). Bei den Galaktomannanen dagegen beeinflusst ein Zusatz von Natronlauge die Viskosität erheblich. Bereits Deuel et al. (21) stellten eine starke Abnahme der Viskosität nach Zugabe von Natronlauge fest, wobei angenommen wurde, dass es sich nicht um einen chemischen Abbau handelt. In der Praxis ist aber gerade ein Viskositätsrückgang im alkalischen Gebiet recht unerwünscht. Diese Alkalilabilität macht sich nämlich bei der Verwendung der Galaktomannane als Druckverdickungsmittel in der Textilindustrie sehr störend bemerkbar, weil besonders beim Druck mit Küpenfarbstoffen unter stark alkalischen Bedingungen gearbeitet wird (33). Aus diesem Grunde wurden alkalibeständige Galaktomannanderivate entwickelt, von denen die Carboxy-methyläther eine weite Verbreitung gefunden haben (21, 39).

Ein erheblicher Teil der vorliegenden Arbeit wurde dem Verhalten der Galaktomannane im alkalischen Gebiet gewidmet, wobei zunächst der Einfluss verschiedener Alkalihydroxyde und -halogenide auf die Viskosität der Galaktomannane untersucht wurde. Die Viskositätsabnahme beträgt durchschnittlich bei Lithiumhydroxyd 30 %, bei Natriumhydroxyd 45 % und bei Kaliumhydroxyd 50 % (bei gleicher Laugenkonzentration von 0,5 N), sie ist demnach umso grösser, je grösser der Ionenradius des Kations ist (vgl. Abb. 13). Prinzipiell verhalten sich Guaran und Carubin gegen Lauge gleich, nur ist der Viskositätsabfall von Guaran immer um einige Prozente grösser als bei Carubin. Die gleiche Wirkung, wenn auch wesentlich schwächer, zeigen die Alkalihalogenide (vgl. Tab. VIII). Kalium, das von den Alkalimetallen am schwächsten hydratisiert ist, bewirkt den grössten Viskositätsabfall, d. h. dieser kommt offenbar nicht durch eine Dehydratation der Galaktomannane zustande. Es ist bemerkenswert, dass der Viskositätsabfall entgegen der lyotropen Ionenreihe zunimmt. Für dieses Verhalten der Galaktomannane sollen zwei mögliche Erklärungen diskutiert werden:

(A) Das Galaktomannan-Molekül verliert durch Zusatz von Lauge seine gestreckte Form und nimmt dabei eine geknäuelte Form an. - Es wurde versucht, durch weitere Messungen mit der Ultrazentrifuge an Guaran mit Alkalihydroxyden als Lösungsmittel, sowie durch Bestimmung der Grenzviskosität weitere Daten für eine Erklärung zu erhalten. Die Ultrazentrifugen-Versuche zeigten, dass sich die Sedimentationskoeffizienten mit Wasser und Alkalihydroxyden als Lösungsmittel - innerhalb der Grenzen des Messfehlers - nicht ändern (vgl. Abb. 9 und 14). Es tritt demnach

keine Spaltung von Bindungen innerhalb der Mannan-Hauptkette ein. Es war daher im ersten Moment nicht verständlich, dass die Grenzviskosität bei Zusatz von Lauge abnimmt (vgl. Tab. VIII); denn sowohl die Sedimentationsgeschwindigkeit als auch die Grenzviskosität werden durch das Volumen der Teilchen bestimmt. Das scheinbare Abnehmen der Grenzviskosität hat aber einen messtechnischen Grund. Die Viskosität ist von der Schubspannung abhängig. Je nach dem in welchem Bereich der Kurve (bedingt durch die Durchflusszeit) man sich bewegt, ist die Extrapolation auf die Konzentration Null mit einem kleineren oder grösseren Fehler behaftet. Für die Abklärung dieser Frage sind allerdings weitere Messungen, insbesondere von Zeit- und Anfahrdefekten, notwendig. - Auch das überaus starke Ansteigen der k_H -Werte (HUGGINS'sche Konstante) weist darauf hin, dass kein Kettenabbau stattfindet (vgl. Tab. X). Das Gleichbleiben der Sedimentationskoeffizienten bedeutet weiter, dass das Galaktomannan-Molekül seine Form als Ganzes bei Zugabe von Lauge nicht wesentlich ändert, d. h. es tritt keine wesentliche Knäuelung ein, da sonst höhere Sedimentationskoeffizienten resultieren müssten. Diese Beobachtungen sprechen gegen die Annahme (A).

Die Galaktomannane liegen in wässriger Lösung zum Teil als Assoziate vor; diese werden durch Alkali gespalten, wodurch die Viskosität abnimmt. - Grössere Unterschiede in den Sedimentationskoeffizienten sind dagegen bei höheren Laugekonzentrationen festzustellen, indem die Sedimentationsgeschwindigkeit mit steigender Laugenkonzentration kleiner wird. Dieses Resultat muss so interpretiert werden, dass die Galaktomannane in Wasser Assoziate bilden, welche durch Zugabe von Lauge aufgespalten werden. Dadurch entstehen kleinere Gebilde oder ein monodisperses System mit geringeren Sedimentationsgeschwindigkeiten. Im übrigen ist die Grenzviskosität der totalwasserlöslichen Fraktion von Carubin höher als diejenige der heisswasserlöslichen Fraktion (vgl. Tab. VIII); diese Tatsache spricht ebenfalls zu Gunsten von Assoziaten in wässriger Lösung.

Zwischen Konstitution und Eigenschaften existieren bei Polysacchariden mannigfache Beziehungen (22). Häufig besitzen ähnlich aufgebaute Polysaccharide deutlich verschiedene Eigenschaften. Geringfügige, analytisch kaum erfassbare Veränderungen eines Polysaccharids können demnach seine Eigenschaften stark verändern. Zur genauen Charakterisierung der Polysaccharide gehört auch die Kenntnis der Konformation der Zuckerbausteine, sowie des ganzen Makromoleküls, d. h. seine räumliche Anordnung und Lage der Atome. Sicher werden viele Eigenschaften (Löslichkeit, Kristallinität, Reaktionsfähigkeit, Komplexbildung, Angreifbarkeit durch Enzyme, usw.) durch die spezielle Konformation mitbestimmt.

Konformations-Untersuchungen an Zuckern sind insbesondere von Reeves (47) ausgeführt worden. Darnach sind für die spannungsfreien Pyranoseringe theore-

tisch zwei Sessel- und sechs Wannenformen möglich, welche die acht Grundformen darstellen (vgl. Abb. 17). Die aktiven Gruppen, es handelt sich vor allem um alkoholische Hydroxylgruppen sitzen nun je nach Konformation axial oder äquatorial am Pyranosering. Da die Sesselform die grössten Möglichkeiten für äquatoriale Substituenten bietet, dürfte sie die am ehesten bevorzugte Konformation der Pyranoseringe sein.

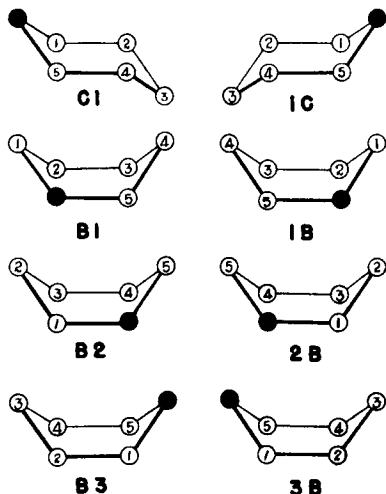


Abb. 17 Die acht theoretisch möglichen, spannungsfreien Pyranose-Konformationen

Die freie Energie der Wannenform ist ca. 1 kcal grösser als diejenige der Sesselform. Mit Hilfe der Instabilitätsfaktoren kann die für die einzelnen Zucker stabilste Konformation vorausgesagt werden. Reeves (47) unterscheidet drei Instabilitätsfaktoren:

(A) Ein Instabilitätsfaktor (i) liegt dann vor, wenn ein grosser polarer Substituent (z. B. eine OH-Gruppe) eine axiale Stellung einnimmt, denn nach Hassel und Ottar (27) ist ein sechsgliedriger, spannungsfreier Ring dann am stabilsten, wenn die grossen Substituenten in äquatorialer Stellung liegen.

(B) Ein weiterer Instabilitätsfaktor ist der sog. $\Delta -2$ Zustand. In diesem Zustand liegt irgend ein grosser am C-Atom 2 befindlicher Substituent in axialer Stellung zwischen den beiden C-O Valenzrichtungen des C-Atoms 1 (vgl. Abb. 18). Der $\Delta -2$ Effekt wird wahrscheinlich durch die ungünstige dipolare Wechselwirkung hervorgerufen.

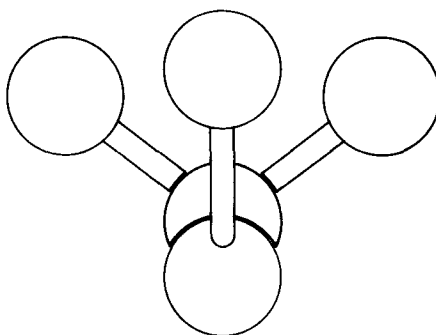


Abb. 18 Der Δ -2 Zustand

(C) Der dritte Instabilitätsfaktor (H) ist der sog. **HASSEL-OTTAR Effekt** (28). Dieser tritt dann ein, wenn die $-\text{CH}_2\text{OH}$ Gruppe am C-Atom 5 zusammen mit einem andern Substituenten auf der gleichen Seite des Ringes in axialer Stellung liegt.

Die einfache Axialität entspricht nach Reeves (47) einer, der Δ -2 Zustand 2, 5 und der **HASSEL-OTTAR Effekt** 0, 5 Instabilitätseinheiten.

Kelly (34) führte noch einen weiteren Instabilitätsfaktor ein: die einfache axiale Stellung der $-\text{CH}_2\text{OH}$ Gruppe am C-Atom 5 (also ohne **HASSEL-OTTAR Effekt**), der zwei Instabilitätseinheiten entsprechen. Im weiteren berechnet er den **HASSEL-OTTAR Effekt** mit 2, 5 Instabilitätseinheiten. Die Arbeiten von Kelly (34) zeigen, dass die theoretisch vorausgesagten Konformationen nach seiner modifizierten Berechnungsweise mit den experimentell gefundenen Konformationen besser übereinstimmen.

Von zwei Konformationen ist nun diejenige die stabilere, welche die kleinere Summe Instabilitätsfaktoren besitzt. Ist der Unterschied gross genug, so existiert die entsprechende Verbindung in nur einer Konformation; ist er dagegen weniger als eine Instabilitätseinheit, so bildet sich in Lösung ein Gleichgewicht zwischen den beiden Konformationen.

Reeves (48) hat zum ersten Mal auf Zusammenhänge zwischen dem optischen Drehvermögen von Kohlehydraten und der Konformation hingewiesen. Diese Zusammenhänge wurden zunächst systematisch an Zuckern, dann aber auch am Beispiel der Amylose untersucht. Die Drehbarkeit um die Glycosidbindung stösst bei der Amylose beinahe in jeder Stellung auf sterische Behinderung. Daher bildet sich in neutralem Medium ein Gleichgewicht der beiden, nahezu in gleichen Beträgen, anwesenden Wannen-Konformationen B 1 und 3 B. Die Annahme von Reeves (48), dass die Konfor-

mation der Glucopyranosidringe durch Lauge aus dem Gleichgewicht $B_1 \rightleftharpoons B_3$ Gleichgewichtszustand in die Richtung der B_3 Konformation verschoben wird, wurde durch das Abnehmen des optischen Drehvermögens der Lösung mit wachsender Laugenkonzentration bewiesen. Die beobachtete Änderung des Drehvermögens ist somit lediglich auf Konformationsänderungen zurückzuführen.

Auf Grund der bei der Amylose gemachten Erfahrungen untersuchten Reeves und Blouin (49) den Einfluss von Natronlauge auf das optische Drehvermögen von verschiedenen Glycosiden. Sie kamen zum Ergebnis, dass sich Hexosen mit axial liegenden OH-Gruppen bei Zugabe von Lauge in eine Wannen-Konformation umorientieren, weil bei dieser die räumlichen Verhältnisse der teilweise dissoziierten OH-Gruppen günstiger sind. So beobachteten sie z. B. bei α - und β -Galaktosiden ein Konformations-Gleichgewicht zwischen den beiden Formen $C_1 \rightleftharpoons B_2$; im alkalischen Gebiet dagegen verschiebt sich dieses Gleichgewicht zugunsten der Wannen-Konformation B_2 . Ursprünglich ist die OH-Gruppe am C-Atom 4 in der C_1 Form axial, durch Umklappen in die Wannen-Konformation B_2 sind die OH-Gruppen an den C-Atomen 2, 3 und 4 äquatorial. Die Konformationsänderung wurde auch hier als Änderung des optischen Drehvermögens festgestellt. Reeves und Blouin (49) konnten weiter zeigen, dass sich die Glycoside in zwei Gruppen einteilen lassen: alkaliunempfindliche und alkaliempfindliche Glycoside. Das optische Drehvermögen der Glycoside der zweiten Gruppe ändert sich nach Zusatz von Natronlauge stark. Die Alkaliempfindlichkeit kann experimentell sehr schön gezeigt werden; trägt man nämlich das optische Drehvermögen als Funktion des Logarithmus der Laugenkonzentration auf, so erhält man eine mit steigender Laugenkonzentration abfallende Kurve. Das Auftreten eines Wendepunktes deutet auf eine Verschiebung des Konformations-Gleichgewichtes hin.

Es wurde vermutet, dass auch für das beschriebene Verhalten der Galaktomannane im alkalischen Gebiet eine Konformationsänderung verantwortlich sein könnte. Daher lag es nahe, das optische Drehvermögen nach Zugabe von Lauge zu untersuchen.

Den Arbeiten von Reeves und Blouin (49) konnte entnommen werden, dass sowohl Methyl- α -galaktosid als auch Methyl- β -mannosid zu den alkaliempfindlichen Glycosiden gehören (die gleichen Bindungstypen kommen bekanntlich auch bei den Galaktomannanen vor). Demnach können Konformationsänderungen sowohl in der Mannan-Hauptkette als auch bei den Galaktose-Seitenästen eintreten. Bei den untersuchten Galaktomannanen wurde in der Tat eine beträchtliche Abnahme des optischen Drehvermögens nach Zugabe von Lauge beobachtet (vgl. Tab. XIII). Trägt man das optische Drehvermögen von Guaran als Funktion des Logarithmus der Konzentration

von Kalilauge auf, so erhält man den in Abb. 19 skizzierten Kurvenverlauf. Der Wendepunkt der Kurve liegt in der Gegend von 0,1 N KOH. Im Falle von Methyl- β -D-altropyranosid, einem ebenfalls alkaliempfindlichen Glycosid, liegt der Wendepunkt bei 0,4 N NaOH (49).

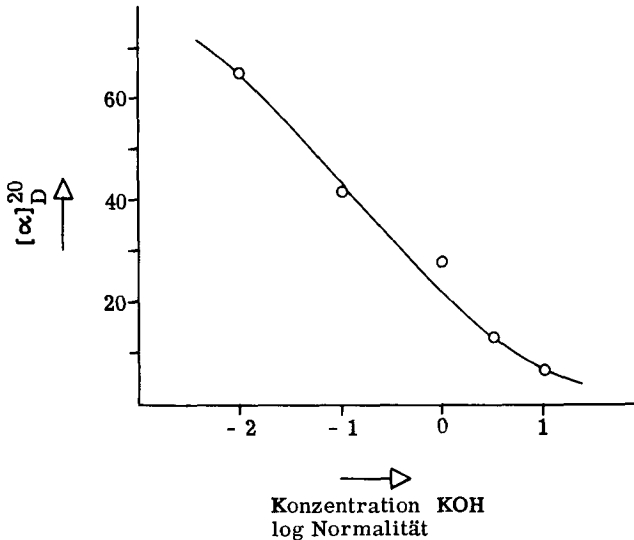


Abb. 19 Der Einfluss von Kaliumhydroxyd auf das optische Drehvermögen von Guarana

Für die weiteren Betrachtungen mussten zunächst die Konformationen der in Galaktomannanen vorkommenden zwei Hexosen, β -Mannose und α -Galaktose, untersucht werden. Die acht Grundformen nach Reeves (47) sind in den Abb. 20 und 21 aufgezeichnet. Die Instabilitätsfaktoren jeder Konformation sind in Tab. XVIII zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass für beide Zuckerbausteine die Konformation C 1 die stabilere Sesselkonformation ist. Im weiteren ist der Tab. XVIII zu entnehmen, dass die B 1 Konformation der β -Mannose eine sehr stabile Wannenkonformation darstellt.

Für die Konformationsänderung der Mannosebausteine der Hauptkette kann folgende Erklärung gegeben werden. - In Analogie zu den Arbeiten von Reeves und Blouin (49) wird angenommen, dass die Mannankette der Galaktomannane in neutraler Lösung in einem Gleichgewicht der beiden Konformationen C 1 \rightleftharpoons B 1 vorliegt. Die beobachtete Abnahme des optischen Drehvermögens weist darauf hin, dass die

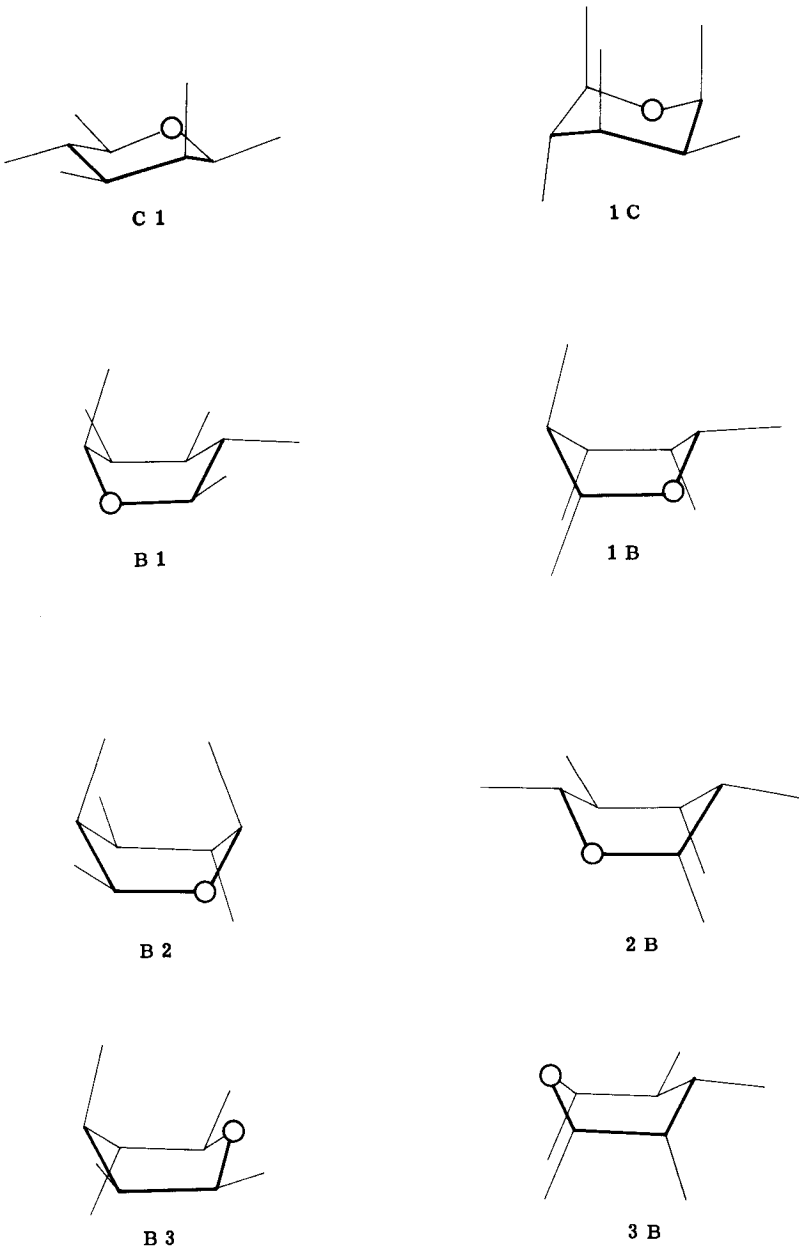


Abb. 20 Die acht spannungsfreien β -Mannose Konformationen

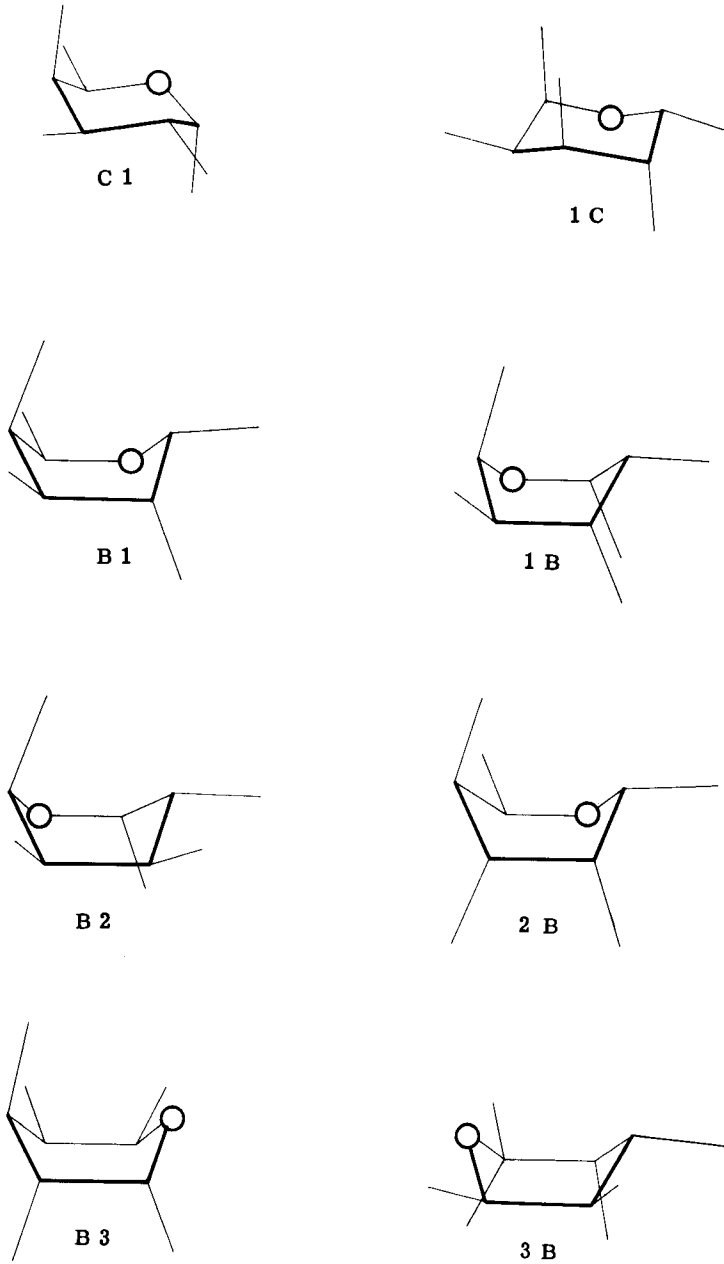


Abb. 21 Die acht spannungsfreien α -Galaktose Konformationen

Tab. XVIII Die Instabilitätsfaktoren der acht Grundformen der Konformationen bei α -Galaktose und β -Mannose

Konformation	Instabilitätsfaktoren *)					
	α -Galaktose			β -Mannose		
C 1	i_1	i_4		$\Delta-2$		
1 C	H	$\Delta-2$	i_3	H	i_1	i_3 i_4
B 1	i_2	i_4		i_1		
1 B	H	i_1	i_3	H	i_2	i_3 i_4
B 2	i_1	i_5		H	i_2	i_4
2 B	i_2	i_3	i_4	i_1	i_3	
B 3	i_1	i_2	i_3	i_3	i_4	
3 B	H	i_4		H	i_1	i_2

*) Die Instabilitätsfaktoren wurden nach Kelly berechnet (34).

i_4 = OH-Gruppe am C-Atom 4 axial

H = HASSEL-OTTAR Effekt

$\Delta-2$ = $\Delta-2$ Zustand (vgl. Abb. 19)

Konformation der Mannopyranosidringe durch Lauge aus dem Gleichgewichtszustand C 1 \rightleftharpoons B 1 in die Richtung der B 1 Konformation verschoben wird. Ueber den Mechanismus dieser Umlagerung bestehen noch keine definitiven Vorstellungen. Ferrer und Overend (24) postulierten dafür die sog. "half-chair-Form", die von Barton et al. (4) am Beispiel des Cyclohexens mit Hilfe von Elektronenbeugungsversuchen bewiesen werden konnte. Abb. 22 zeigt den vermutlichen Mechanismus der Umlagerung der C 1 in die B 1 Konformation bei β -Mannose nach Zugabe von Lauge. Die $\Delta-2$ Instabilität der C 1 Konformation dürfte sich vor allem im alkalischen Gebiet ungünstig auswirken. Die schon in neutraler Lösung grosse negative Ladungsdichte (OH-Gruppe am C-Atom 2, sowie zwei substituierte Sauerstoffatome am C-Atom 1), fällt noch bedeutend stärker ins Gewicht, wenn die OH-Gruppe am C-Atom 2 teilweise dissoziiert ist. Die B 1 Konformation, die nur die einfache Axialität besitzt, dürfte demnach nach dem Umklappen gegenüber der C 1 Konformation also ausserordentlich begünstigt sein. Die Konformationsänderung der Man-

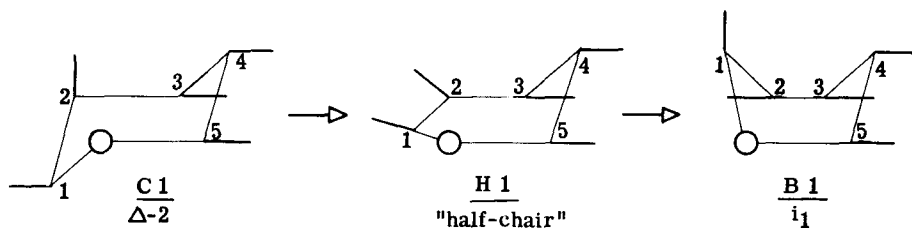


Abb. 22 Der vermutliche Mechanismus der Umwandlung der C 1 in die B 1 Konformation bei β -Mannose nach Zugabe von Lauge

nosebausteine wird allerdings durch deren Bindung in der Kette (C-Atome 1 und 4) erschwert, wodurch die einzelnen Mannosemoleküle in ihrer Beweglichkeit gehindert werden. Es werden aber keineswegs sämtliche Mannosebausteine ihre Konformation ändern; vielmehr dürfte ihre Zahl von der Laugenkonzentration abhängen.

Eine weitere Beobachtung liess sich mit der B 1 Konformation der Mannose sehr gut erklären: die Komplexbildung von Galaktomannanen mit Borationen. Die OH-Gruppen an den C-Atomen 2 und 3 liegen nach Capon und Overend (11) räumlich ausserordentlich günstig, nämlich 2,3-cis (äquatorial/äquatorial), was für die Bildung des unlöslichen Boratkomplexes Bedingung ist. Die B 1 Konformation ist auch hier gegenüber der C 1 Konformation im Vorteil, bei der die OH-Gruppen an den C-Atomen 2 und 3 eine 2,3-Cis (axial/äquatoriale) Stellung einnehmen, also weiter auseinanderliegen.

Für eine Konformationsänderung der Galaktose spricht vor allem die Tatsache, dass die Galaktose nicht substituiert ist. Die $\alpha(1 \rightarrow 6)$ glycosidische Bindung zur Mannose gestattet eine ziemlich unbehinderte freie Drehbarkeit, wodurch allfälliges Umklappen in eine Wannen-Konformation erleichtert würde. Dagegen gibt es bei der Galaktose keine Wannenform, die so stabil ist, wie die B 1 Konformation der Mannose. Bei der Konformationsänderung der Galaktose handelt es sich wahrscheinlich lediglich um die Ausbildung eines Gleichgewichtszustandes zwischen verschiedenen Wannen-Konformationen.

Die Abnahme der Viskosität nach Zugabe von Lauge erklärt sich einerseits durch die Spaltung von Assoziaten und andererseits vielleicht auch durch eine Verkürzung der Mannan-Hauptkette. Am Modell kann gezeigt werden, dass die Wannen-Konformation B 1 der Mannose gegenüber der Sesselkonformation C 1 eine um 25 % kürzere Identitätsperiode besitzt. Die beschriebene Konformationsänderung würde somit eine Verkürzung der Kette bewirken.

4. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Molekulargewichte von Guaran und Carubin wurden bestimmt. Die Bestimmung der reduzierenden Endgruppen ergab bei Guaran ein Molekulargewicht von 250 000, bei Carubin ein solches von 300 000. Das mit der Ultrazentrifuge gemessene Molekulargewicht ergab für Guaran einen Wert von 1 900 000. Für die Polymerisationsgrade der Mannankette ergab sich bei Guaran ein Wert von ca. 900 und bei Carubin ein solcher von ca. 1500 Anhydromannose-Einheiten.

2. Carubin wurde in eine kaltwasser- und eine heisswasserlösliche Fraktion aufgeteilt. Die beiden Fraktionen unterscheiden sich im Molekulargewicht und im Verhältnis Galaktose/Mannose. Die kaltwasserlösliche Fraktion besitzt ein Verhältnis Galaktose/Mannose von 1 : 1,2 und ein Molekulargewicht von 150 000, die heisswasserlösliche Fraktion dagegen ein Verhältnis Galaktose/Mannose von 1 : 3,3 und ein Molekulargewicht von 650 000.

3. Guaran und Carubin besitzen eine im ersten und dritten Quadranten positive Doppelbrechung; zwischen den beiden Galaktomannanen bestehen in der Doppelbrechung keine spezifischen Unterschiede.

4. Mit einer aus grünen Kaffeebohnen extrahierten α -Galaktosidase wurde bei verschiedenen Galaktomannanen Galaktose abgespalten. Nach einmaliger Enzymzugabe wurden bei Guaran und anderen Galaktomannanen nur 20 % der theoretisch abspaltbaren Menge Galaktose abgespalten, bei Carubin dagegen 70 %.

5. Beim Stehenlassen von Galaktomannanlösungen tritt ein Viskositätsabfall ein, der bei Guaran nach 8 Tagen 23 % und bei Carubin 5 % der Ausgangsviskosität betrug.

6. Beim Erhitzen von wässrigen Galaktomannanlösungen tritt ebenfalls ein Viskositätsabfall ein. Durch Messung der reduzierenden Endgruppen konnte gezeigt werden, dass bei 100°C nach 6 Stunden durchschnittlich eine glycosidische Bindung der Mannan-Hauptkette pro Molekül gespalten wird.

7. Das Verhalten der Galaktomannane im alkalischen Gebiet wurde eingehend studiert. Dazu wurde die Viskosität, das optische Drehvermögen und die Sedimentationsgeschwindigkeit von Guaran nach Zugabe von verschiedenen Alkalihydroxyden gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Viskositätsabnahme nach Zugabe von Lauge wahrscheinlich auf eine Spaltung der in neutralem Milieu vorliegenden Assoziate zurückzuführen ist. Die Abnahme des optischen Drehvermögens wird durch Konformationsänderungen verursacht.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams, M., Richtmyer, N. K., und Hudson, C. S.,
J. Am. Chem. Soc. 65, 1369 (1943)
2. Anagnostopoulos, C., Courtois, J. E., und Petek, F.,
Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 1115 (1954)
3. Baker, G. L., Carrow, J. W., und Woodmansee, C. W.,
Food Ind. 21, 617 (1949)
4. Barton, D. H. R., Cookson, R. C., Klyne, W., und Shoppee, C. W.,
Chem. & Ind. 21 (1954)
5. Bau, A., Chem. Ztg. 19, 1873 (1895)
6. Beckmann, C. O., und Rosenberg, J.,
Ann. N. Y. Acad. Sci. 46, 209 (1945)
7. Bierry, H., Biochem. Z. 44, 446 (1912)
8. Boggs, A. D., Master's Thesis, Purdue University, Lafayette, Ind. (1949)
9. Bollinger, R., und Münzel, K., Pharm. Acta Helv. 34, 89 (1959)
10. Calamari, J., Master's Thesis, Iowa State College (1953)
11. Capon, B., und Overend, W. G., Adv. Carbohydr. Chem. 15, 11 (1960)
12. Courtois, J. E., und Petek, F.,
Bull. Soc. Chim. Biol. 39, 715 (1957)
13. Courtois, J. E., Anagnostopoulos, C., und Petek, F.,
Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 1277 (1958)
14. Courtois, J. E., Bull. Soc. Chim. Biol. 42, 1715 (1960)
15. Courtois, J. E., und Percheron, F.,
Bull. Soc. Chim. Biol. 43, 167 (1961)
16. Cushing, M. L., und Schumann, K. R., Tappi 42, 1006 (1959)
17. Czaja, A. T., Z. Unters. Lebensm. 112, 190 (1960)
18. Deuel, H., und Neukom, H., Makromol. Chem. 4, 97 (1949)
19. Deuel, H., Huber, G., und Solms, J., Exper. 6, 138 (1950)
20. Deuel, H., Leuenberger, R., und Huber, G.,
Helv. Chem. Acta 33, 942 (1950)
21. Deuel, H., Solms, J., und Neukom, H., Chimia 8, 64 (1954)
22. Deuel, H., und Neukom, H., Kolloid-Z. 18, 91 (1958)
23. Elias, H. G., Makromol. Chem. 29, 30 (1959)
24. Ferrier, R. J., und Overend, W. G., Quart. Rev. 13, 265 (1959)
25. Fischer, E., und Lindner, P.,
Ber. dtsh. chem. Ges. 28, 3034 (1895)

26. Granath, K. A. , J.Colloid Sci. 13, 308 (1958)
27. Hassel, O. , und Ottar, B. , Acta Chem.Scand. 1, 929 (1947)
28. Hassel, O. , und Ottar, B. , Quart.Rev. 7, 221 (1953)
29. Helferich, B. , und Vorsatz, F. , H.Physiol.Z. 237, 254 (1935)
30. Hirst, E. L. , und Jones, J. K. N. , J.Chem.Soc. 1278 (1948)
31. Hofmann, E. , Biochem. Z. 273, 198 (1934)
32. Husemann, E. , J.Prakt.Chem. 155, 241 (1940)
33. Jülicher, W. , Melliand Textilber. 36, 477 (1955)
34. Kelly, R. B. , Can.J.Chem. 35, 149 (1957)
35. Koike, H. , Dokutsugaku Zasshi 63, 228 (1954)
Ref. in Chem.Abstr. 49, 7759 (1955)
36. Kubal, J. V. , und Gralen, N. , J.Colloid Sci. 3, 457 (1948)
37. Lauffer, M. A. , Science 87, 469 (1938)
38. Launer, H. F. , und Tomimatsu, Y. , Anal.Chem. 31, 1385 (1959)
- 38A. Meier, H. , Acta Chem.Scand. 12, 144 (1958)
39. Moe, O. A. , U.S.P. 2 477 544 (1949)
40. Morris, Z. B. D. L. , Science 107, 252 (1948)
41. Neuberg, C. , Biochem.Z. 3, 519 (1907)
42. Newburger, S. H. , Jones, J. H. , und Clark, G. R. ,
Proc.Sci.Sect.Toilet Goods Assoc. No. 19, 25 (1953)
43. Palmer, K. J. , und Ballantyne, M. , J.Am.Chem.Soc. 72, 736 (1950)
44. Partridge, S. M. , Nature 164, 443 (1949)
45. Petek, F. , und Dong, T. , Enzymologia 23, 133 (1961)
46. Rutter, L. , Nature 161, 435 (1948)
47. Reeves, R. E. , Adv.Carbohydr.Chem. 6, 107 (1951)
48. Reeves, R. E. , J.Am.Chem.Soc. 76, 4595 (1954)
49. Reeves, R. E. , und Blouin, F. A. , J.Am.Chem.Soc. 79, 2261 (1957)
50. Signer, R. , Makromol.Chem. 17, 39 (1955)
51. Smith, F. , J. Am.Chem.Soc. 70, 3249 (1948)
52. Svedberg, T. , und Pedersen, K. O. , "Die Ultrazentrifuge" (1940)
53. Swanson, J. W. , Tappi 39, 257 (1956)
54. Unveröffentlichte Untersuchungen, Agr.chem.Inst.ETH, Zürich
55. Weidenhagen, R. , und Renner, A. ,
Z.Wirtschaftsgruppe Zucker-Ind. 86, 22 (1936)
Ref. in Chem.Abstr. 30, 3939 (1936)
56. Whistler, R. L. , und Smart, C. L. , "Polysaccharide Chemistry" (1950)
57. Whistler, R. L. , und BeMiller, J. N. , J.Org.Chem. 26, 2886 (1961)

Lebenslauf

Am 19. März 1935 wurde ich, Paul André Hui, von Wagenhausen (Kt. Thurgau) in Basel geboren. In Weinfelden (Kt. Thurgau) besuchte ich sechs Jahre die Primarschule und zwei Jahre die Sekundarschule. Im Frühjahr 1949 trat ich in die Kantonschule in Frauenfeld ein, wo ich im Herbst 1953 die Maturitätsprüfung (Typus B) bestand. Im Herbst des gleichen Jahres begann ich das Studium an der Abteilung für Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, und erhielt im Herbst 1958 das Diplom als Ingenieur-Chemiker. Seither arbeitete ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Agrikulturchemischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule; hier wurde auch die vorliegende Arbeit ausgeführt.