

ONDERZOEKINGEN OVER PECTINESTOFFEN EN HARE
ENZYMATISCHE ONTLEDING

ONDERZOEKINGEN OVER PECTINESTOFFEN EN HARE ENZYMATISCHE ONTLEDING

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD
VAN DOCTOR IN DE TECHNISCHE
WETENSCHAP AAN DE TECHNISCHE
HOOGESCHOOL TE DELFT, OP GEZAG
VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
IR. N. C. KIST, HOOGLEERAAR IN DE
AFDEELING DER WEG- EN WATER-
BOUWKUNDE, VOOR EEN COMMISSIE
UIT DEN SENAAAT TE VERDEDIGEN
OP MAANDAG 18 JUNI 1928, DES NA-
MIDDAGS TE DRIE UUR, DOOR

ALIDA CATHARINA SLOEP

SCHEIKUNDIG INGENIEUR

GEBOREN TE LEEUWARDEN



DELFT — W. D. MEINEMA — UITGEVER — 1928

1020 E 43

Aan den Heer P. J. F. Kater

Bij het voltooiën van dit proefschrift past het mij U allen, Hooggeleerden van de Afdeeling der Scheikundige Technologie, hartelijk dank te zeggen voor de wetenschappelijke vorming, die ik onder Uwe leiding mocht ontvangen en die mij mede tot dit proefschrift in staat stelde.

Boven allen U, Hooggeleerde VAN ITERSON, grooten dank voor Uwe leiding, zoowel bij mijn ingenieursstudie als wel bij het bewerken dezer dissertatie, waarvan het practische gedeelte op het Laboratorium voor Technische Botanie werd uitgevoerd. Slechts noode heb ik U naar Indië zien vertrekken, toen ik bijna aan het einde dezer studie was gekomen en zoo gaarne nog van Uwe inzichten had gebruik gemaakt. Zeer veel dank ben ik U verschuldigd voor de belangstelling, die Gij bij mij hebt weten op te wekken voor de wetenschappelijke problemen, die met Uw onderwijs verband houden. Uwe talrijke niet genoeg te waardeeren college's en cursussen en niet in het minst de vele leerrijke gesprekken, welke Gij met mij voerdet over het onderwerp van dit proefschrift — een onderwerp, dat nog zoo geheel nieuw en in zeer verwarden vorm voor ons lag — zullen bij mij steeds als dankbare herinneringen blijven leven. Mocht ik later in de gelegenheid worden gesteld dit onderzoek nog verder uit te breiden, dan hoop ik daarbij opnieuw gebruik te mogen maken van Uwe hulp, die ik tot heden in zoo hooge mate op prijs heb gesteld.

U, Hooggeleerde KLUYVER, die zoo op het allerlaatst mij nog tot Promotor wildet zijn, ben ik daàrvoor en voor den velen tijd en moeite, die Gij aan dit proefschrift hebt ten beste gegeven zeer veel dank verschuldigd. Ik waardeer ten zeerste de wijze, waarop Gij van Uw standpunt uit hebt gecritiseerd en beoordeeld de toen voor U nog zoo losstaande vraagstukken en gegevens. Veel kennis deed ik dezen laatsten tijd nog op in Uw gastvrij huis, veel vergezichten hebt Gij mij nog getoond, te veel om in dit proefschrift nog verwerkt en bewerkt te kunnen worden.

U, Hooggeleerde VAN NIEUWENBURG, spreek ik mijn welgemeenden dank uit voor de groote vrijheid, die Gij mij deze laatste maanden hebt willen laten voor het afwerken van deze dissertatie.

In dezelfde mate geldt dit voor U, Zeergeleerde PFEIFFER, die mij, tijdens Uw beheer, na het vertrek van Professor VAN ITERSON

zoo ruimschoots tijd hebt gelaten voor het verrichten van mijne onderzoekingen. Dat mij nog zooveel gelegenheid overbleef voor het verrichten van eigen werkzaamheden is mede te danken aan U, Meijuffrouw KLEINHOONTE, die mij mijn taak als assistente zoozeer hebt verlicht.

EILERS, U gedenk ik hierbij om onze vele gesprekken over de moeilijkheden in dit onderwerp. Hoeveel tijd toch hebben wij samen in een critisch beschouwen en redeneeren aan dit alles besteed. Voor deze hartelijke belangstelling ben ik U ten zeerste erkentelijk.

Ook U, VAN DER VALCK, mijn besten dank voor de groote bereidwilligheid waarmede Gij zoo vele analyses voor mij hebt verricht en mij hierdoor van zooveel tijdroovenden arbeid hebt vrijgemaakt.

Een vriendelijk woord van dank moge ook hier gewijd zijn aan het personeel van het Laboratorium en den Cultuurtuin voor Technische Botanie voor de uitstekende hulp die ik steeds van hen heb ontvangen.

En tenslotte U, waarde Heer KATER, die van jongs af achter mij hebt gestaan en zonder wien ik tot deze promotie niet zou zijn gekomen, U draag ik dit werk op; het is voor mij, als samenvatting van al die jaren studie het beste wat ik op dit moment kan geven. Wilt Gij dat aanvaarden als het bewijs van eene groote dankbaarheid, die hier is gegroeid voor alles wat Gij voor mij hebt gedaan en ik van U mocht ondervinden.

INHOUD.

	Blz.
INLEIDING	13
HOOFDSTUK I.	
Overzicht van vroegere onderzoekingen over de chemie der pectinestoffen	18
§ 1. Oudste onderzoekingen	18
§ 2. De onderzoekingen van FRÉMY	19
§ 3. De verdere tot 1900 verrichte onderzoekingen omtrent de chemie van de pectinestoffen	24
§ 4. De onderzoekingen der laatste jaren	26
a. VON FELLEBERG.	
b. EHRLICH.	
c. Verdere onderzoekingen.	
HOOFDSTUK II.	
Vroegere onderzoekingen over de localisatie en de wijze van voorkomen der pectinestoffen in de plant	38
§ 1. De onderzoekingen van MANGIN	38
§ 2. Voortzetting van het werk van MANGIN in de laatste vijf en twintig jaren	42
HOOFDSTUK III.	
Huidige stand van het vraagstuk der chemische samenstelling der pectinestoffen	46
HOOFDSTUK IV.	
De bij het chemisch onderzoek der pectinestoffen toegepaste bepalingmethoden	52
§ 1. Inleidende opmerkingen	52
§ 2. Bepaling van galacturonzuur	53
a. <i>De furfurolphloroglucidemethode van TOLLENS.</i>	
b. <i>De koolzuurmethode volgens LEFÈVRE en TOLLENS.</i>	
c. <i>De slijmzuurmethode volgens TOLLENS-VAN DER HAAR.</i>	

	Blz.
§ 3. De bepaling van methylalcohol	62
§ 4. De bepaling van galactose	64
§ 5. De bepaling van arabinose	65
§ 6. De bepaling van azijnzuur en aceton	65
§ 7. Samenvatting en bepaling der onveranderde pectine- stoffen	66

HOOFDSTUK V.

Bereiding en analyse van verschillende pecti- nestoffen uit citroenschillen	69
§ 1. De protopectine	69
§ 2. De pectine	71
§ 3. Zure pectine en de daarvan afgeleide zouten	75
§ 4. Pectinezuur en de daarvan afgeleide zouten	76
§ 5. Bereiding van het barium-galacturonaat uit citroen- pectine	80
§ 6. Interpretatie der resultaten en benadering van de constitutie van citroenpectine	81
Aanhangsel	89

HOOFDSTUK VI.

Vroegere onderzoekingen over pectase	92
§ 1. Onderzoekingen tot 1900	92
§ 2. Nieuwere onderzoekingen	97
§ 3. Samenvatting	101

HOOFDSTUK VII.

Eigen waarnemingen over de inwerking van pectase op pectinepraeparaten	102
§ 1. Inleidende opmerkingen	102
§ 2. Methoden voor het aantoonen van pectase	102
a. De gelatineeringsmethode.	
b. Methoden, welke op het directe aantoonen van de vor- ming van het pectinezuur berusten.	
c. De op het aantoonen van afgesplitsten methylalcohol be- rustende methode.	

	Blz.
§ 3. Bestudeering van het verloop der pectasewerking, met behulp van de methylalcoholmethode	106
§ 4. Proefnemingen over de geleeringssnelheid van pectineoplossingen	110
§ 5. De viscositeitsverandering, welke een pectineoplossing onder den invloed van pectase ondergaat	113

HOOFDSTUK VIII.

Vroegere onderzoekingen over protopectinase en pectinase

120

§ 1. Inleiding	120
§ 2. De protopectinase	122
a. Onderzoekingen over de productie van protopectinase door micro-organismen.	
b. De onderzoekingen over het optreden van protopectinase in hoogere planten.	
§ 3. De pectinase	131

HOOFDSTUK IX.

Eigen onderzoekingen over het voorkomen en de beteekenis van protopectinase en pectinase

134

§ 1. Doel der proefnemingen	134
§ 2. De gebruikte methodiek voor het aantoonen van protopectinase	135
§ 3. Bereiding en eigenschappen eener bacteriënprotopectinase	137
§ 4. Het aantoonen van protopectinase in verschillende schimmelsoorten	140
§ 5. De aantasting van protopectine door oxalaten en andere niet-enzymatische agentia	143
§ 6. De enzymen, welke werkzaam zijn bij de omzettingen der pectinestoffen tijdens het „rot“-worden van den mispel	150
§ 7. Waarnemingen omtrent het voorkomen van pectinase	153
§ 8. Samenvattend overzicht van het voorkomen der pectine-enzymen in de door mij onderzochte materialen .	157

SAMENVATTING DER RESULTATEN . . . 159

INLEIDING.

De in 1824 door BRACNOT verrichte bereiding van pectinezuur en de eenige jaren later volgende isolatie van pectine zijn het begin geweest van een lange reeks van onderzoekingen over deze belangrijke plantaardige celwandstof. Daarbij is duidelijk aan het licht gekomen, dat eenerzijds de in verschillende planten voorkomende „pectinen” onderling merkbaar in eigenschappen afwijken en dat anderzijds ook in éénzelfde plantendeel uiteenlopende stoffen voorkwamen, welke toch alle een enge verwantschap met BRACNOT's product vertoonen. Een en ander heeft er toe geleid het begrip „pectine” ruimer te formuleeren en tot het bestaan van een geheele groep „pectinestoffen” te besluiten.

Ofschoon de in den laatsten tijd door VON FELLEBERG en door EHRLICH verrichte belangrijke onderzoekingen over de scheikunde der pectinestoffen ons inzicht in de constitutie dezer verbindingen aanmerkelijk hebben vermeerderd, kan het, na hetgeen boven werd opgemerkt, geen verwondering wekken, dat er op dit gebied nog een ruim arbeidsveld braak ligt.

In de eerste plaats moet er in dit verband op worden gewezen, dat de door genoemde biochemici verkregen uitkomsten nog een in hoofdzaak fragmentarisch karakter dragen, met dien verstande, dat een eenigszins meer systematisch onderzoek van de geheele reeks van verbindingen, welke de protopectine met haar eenvoudigste bouwsteenen verbindt, nog niet heeft plaats gehad. Maar voorts moet worden geconstateerd, dat ook het belangrijke vraagstuk van de vorming en de omzetting der pectinestoffen in de levende plant, alsmede dat van de aantasting dezer stoffen door microorganismen, in het licht der bovengenoemde onderzoekingen hernieuwde bewerking vereischt.

In dit proefschrift is er nu naar gestreefd te komen tot de isolatie van enkele pectinestoffen, waarna door de bereiding en het onderzoek van verschillende afbraakproducten, getracht is eenig licht te werpen op de constitutie van de genoemde complexe verbindingen.

Teneinde het verband met de in dit opzicht in de literatuur aanwezige gegevens te verzekeren, bleek het noodzakelijk deze aan een kritische bespreking te onderwerpen.

Duidelijk kwam daarbij aan het licht de min of meer chaotische toestand, waarin dit onderdeel der phytochemie heden ten dage nog verkeert, hetgeen niet alleen tot uiting komt in het feit, dat door verschillende onderzoekers uiteenlopende benamingen voor in wezen gelijksoortige producten worden gebezigd, doch ook daarin, dat omgekeerd niet zelden een zelfde benaming voor onderling essentieel verschillende producten toepassing vindt. Een en ander noopte mij wat uitvoeriger op de uitkomsten der vroegere onderzoekers in te gaan en deze gegevens aan een schifting te onderwerpen.

Hiernaast heb ik mij tot taak gesteld materiaal te verzamelen over de veranderingen, welke de pectinestoffen eensdeels in de levende plant, waarin zij voorkomen, anderdeels onder den invloed van eenige micro-organismen, ondergaan. Hiertoe is door mij een nadere studie van de werking der uit de genoemde levende cellen af te scheiden enzymatische principes verricht.

Dit deel van het onderzoek maakte het wenschelijk tevens aandacht te schenken aan den invloed, welke door verschillende, fysiologisch belangrijke chemische verbindingen — in het bijzonder ook organische zuren en hunne zouten — op bepaalde pectinestoffen wordt uitgeoefend.

Alvorens deze Inleiding af te sluiten, wil ik er hier ter plaatse op wijzen, dat een nadere bestudeering van de pectinestoffen ook van direct technisch belang mag worden geacht en dat het zich laat aanzien, dat de beteekenis hiervan in de toekomst nog zal stijgen.

Aangezien de gegevens, welke deze uitspraak rechtvaardigen, grootendeels zeer verspreid in de literatuur voorkomen¹⁾, lijkt het niet overbodig deze hieronder kort samen te vatten.

In de eerste plaats zij dan opgemerkt, dat bij de fabricage van geleien de in de vruchten aanwezige pectine van doorslaggevende beteekenis is voor het verkrijgen van een voor den consument aantrekkelijk product, om welke reden er dan ook door den fabrikant groote aandacht aan wordt besteed.

Het kan dan ook geen verwondering wekken, dat men in den laatsten tijd er toe is overgegaan, zich in bepaalde gevallen onafhankelijk te maken van de hoeveelheid en de hoedanigheid der in de uitgangsmaterialen aanwezige pectinestoffen, door daaraan bij

¹⁾ Men vergelijke evenwel ook: R. SUCHARIPA, Die Pektinstoffe, Braunschweig, 1925.

de verwerking bepaalde pectinepraeparaten toe te voegen. Deze rationalisatie van de gelei-industrie heeft geleid tot het ontstaan van een nevenindustrie, welke het vervaardigen van pectinestoffen als handelsproduct beoogt, iets, waardoor de technische beteekenis van de pectine in hooge mate is gestegen.

Het eerste octrooi in zake de technische pectinebereiding is in 1912 in de Vereenigde Staten van Amerika verleend¹⁾.

Sinds dien tijd heeft de pectine-industrie zich daar te lande belangrijk uitgebreid. Maar ook vele Europeesche fabrieken hebben zich sedert toegelegd op de winning van pectine, voornamelijk uit bijproducten van de verwerking van appels en citroenen, waarbij producten van zeer uiteenlopende zuiverheid en vorm (in poedervorm, al of niet vermengd met suiker, of als zeer geconcentreerd extract) verkregen worden.

Wat de verdere toepassing van de pectine betreft, zij er hier terloops melding van gemaakt, dat EHRLICH tijdens den wereldoorlog het voorstel deed om bietenpulp tot menschelijk voedsel te verwerken, door uit de daarin aanwezige pectinestoffen door hydrolytische splitsing galactose te bereiden. Van meer practische beteekenis lijkt evenwel de door EHRLICH²⁾ gepatenteerde bereidingswijze van kleefstoffen uit bietensnijdsels. Het kleefvermogen van deze producten schijnt nauw verband te houden met het daarin voorkomende, uit de pectinestoffen afkomstige, polygalacturonzuur.

DORE³⁾ heeft voorts het denkbeeld geopperd, om uit de pectine slijmzuur te bereiden, welk zuur in Amerika in bakpoeders veelvuldige toepassing vindt. Tot dusver wordt dit zuur meestal uit het hout van *Larix occidentalis* Nutt. bereid, waarbij evenwel slechts een rendement van 7 à 8% wordt verkregen. DORE raamt daarentegen voor droge bietenpulp een opbrengst van 18% aan slijmzuur.

Het is verder nauwelijks aan twijfel onderhevig, dat een vermeerdering van onze kennis der uiteenlopende pectinestoffen nog tot een aanmerkelijk veelzijdiger toepassing dezer stoffen zal leiden.

In dit verband is het nu van groote beteekenis, dat er nog reusachtige hoeveelheden grondstoffen, welke voor de bereiding van pectinestoffen in aanmerking komen, beschikbaar zijn. Volgens

¹⁾ Zie: W. H. DORE, Journ. Ind. Eng. Chem. 16, pag. 1042, (1924).

²⁾ D. R. P. Nr. 384772 van 11 April 1917, Kl. 120, Groep 11.

³⁾ l. c. pag. 1044.

WALTON en BIDWELL ¹⁾ is de hoeveelheid appels, die in de Vereenigde Staten voor de ciderfabricage wordt verbruikt, te schatten op $\pm 22.500.000$ bushels (ieder van 48 pounds), hetgeen overeenkomt met 540.000 ton. Hierbij zijn nog buiten beschouwing gelaten de groote hoeveelheden appels, die op de „farms” zelf tot cider worden verwerkt. Aannemende, dat de appels ongeveer 1% pectine bevatten, zou men dus per jaar 5400 ton watervrije pectine kunnen verkrijgen uit deze ééne grondstof. De appelpulp vindt weliswaar thans voor het grootste gedeelte als veevoeder nog nuttige toepassing, maar men zou volgens de genoemde schrijvers deze pulp na de verwijdering van pectine nog even goed voor hetzelfde doel kunnen gebruiken. Volgens POORE ²⁾ wordt er in Californië alleen 30.000 ton afval van citroenen geproduceerd, als bijproduct van de citroenzuurindustrie, welke citroenresten $\pm 1,95\%$ pectine zouden bevatten, hetgeen dus een jaarlijksche productie van 585 ton citroenpectine zou kunnen beteekenen. Volgens WILSON ³⁾ zou het afval van de citroenzuurindustrie zelfs wel 2,5 à 4% pectine bevatten, hetgeen dus nog een belangrijk verhoogde productie van citroenpectine mogelijk zou maken. De bietenpulp uit de suikerfabrieken zou, volgens DORE, ook een enorme bron voor de pectine-industrie kunnen worden. In de Vereenigde Staten alleen zouden reeds 100.000 ton gedroogde pulp 's jaars, dat is ± 25.000 ton pectine kunnen worden verkregen, terwijl Duitschland naar een schatting van EHRlich per jaar 176.000 ton pulp zou kunnen opleveren.

Terwijl de bestudeering der pectinestoffen reeds een omwenteling in de *bietsuikerindustrie* heeft teweeggebracht, in zooverre dat het voorkomen dezer stoffen in de bieten er toe heeft geleid, het diffusiesysteem in te voeren, mag een vermeerdering van de kennis der pectinestoffen behalve voor de deze stoffen isoleerende en verwerkende industrieën ook nog van belang worden geacht voor andere industrieele processen. Ik noem nog slechts *de bereiding van vezelstoffen*, in het bijzonder van vlas en hennep, waar de pectinestoffen door roting in oplossing moeten worden gebracht om de bastbundels vrij te maken, *de ciderfabricage*, waar de pectinestoffen oorzaak kunnen zijn van de aanwezigheid in dit product

¹⁾ WALTON and BIDWELL, U. S. Dept. Agr. Dept. Bull. 1166, pag. 5, (1923).

²⁾ H. D. POORE, Chem. Age (N. Y.) 30, pag. 433, (1922).

³⁾ C. P. WILSON, Journ. Ind. Eng. Chem. 17, pag. 1065, (1925).

van niet te verwaarloozen hoeveelheden voor de gezondheid schadelijken methylalcohol, terwijl tenslotte de door NEUBERG's¹⁾ recente onderzoekingen aan het licht gekomen beteekenis der pectine-stoffen *voor de bereiding en verwerking van tabak* hier nog moge worden gememoreerd.

¹⁾ C. NEUBERG und M. KOBEL, Biochem. Zeitschr. 179, pag. 459, (1926); Ibid. 190, pag. 232, (1927).

HOOFDSTUK 1.

OVERZICHT VAN VROEGERE ONDERZOEKINGEN OVER DE CHEMIE DER PECTINESTOFFEN.

§ 1. Oudste onderzoekingen.

Zooals reeds in de Inleiding werd vermeld, mag BRACONNOT¹⁾ de ontdekker van de pectinestoffen worden genoemd. Hij vond in het jaar 1824 in de *topinamboerknollen* een stof, die met zuur neergeslagen kon worden en noemde deze stof *pectinezuur*, naar het Grieksche *πηκτις* = gelei, daar ze een geleiachtig voorkomen en een zuur karakter had.

Vóór BRACONNOT waren er reeds eenige onderzoekers geweest, die deze zelfde geleiachtige stof hadden waargenomen, maar deze hadden de stof niet verder onderzocht.

BRACONNOT bereidde zijn pectinezuur door middel van eene warme alkalische extractie van verschillende plantendeelen, waarna hij het pectinezuur met zoutzuur uit het extract als eene geleiachtige massa neersloeg. De zoo verkregen pectinestof, welke vrij sterk zuur reageerde, was slecht oplosbaar, ook zelfs in kokend water. Hij kon uit eene dergelijke zeer weinig geconcentreerde oplossing met verschillende alkali- en aardalkalizouten, met alcohol en nog vele andere reagentia een neerslag verkrijgen, dat eveneens een geleiachtig voorkomen had.

Eenige jaren later bereidde BRACONNOT eene neutrale pectinestof door neerslaan van plantensappen met alcohol. Er ontstond hierbij eene geleiachtige stof, die hij *pectine* noemde. Met zoutzuur wist hij hieruit weer het bovengenoemde pectinezuur te verkrijgen, en kwam hierdoor tot de conclusie, dat de pectine het karakter had van een zout of misschien van een ester. Hij begreep al spoedig, dat deze neutrale pectine een essentieel bestanddeel was van de vruchtengeleien en hij was dan ook de eerste, die met behulp van suiker en pectine eene kunstmatige gelei fabriceerde. Ook in de

¹⁾ H. BRACONNOT, Ann. de Chim. et de Phys., (2), 28, pag. 173, (1824); Ibid. 37, pag. 266, (1831); Ibid. 50, pag. 376, (1832). Berzelius Jahresber. phys. Wiss. 12, pag. 205, (1833); Ibid. 13, pag. 315, (1834).

geneeskunde wist hij van de pectinestoffen gebruik te maken, door ze aan te bevelen als tegengift bij metaalvergiftigingen, b.v. bij kopervergiftiging, daar pectinezuur met verschillende zware metalen onoplosbare zouten vormde.

Na BRACONNOT hebben tal van andere bekende onderzoekers zich met de studie der pectinestoffen bezig gehouden. Zoo beschreef PAYEN¹⁾ het voorkomen van pectinestoffen in de tusschenlamellen van het plantenweefsel en wel in den vorm van *calciumpectaat*. G. J. MULDER²⁾ evenwel geloofde niet, dat er *calciumpectaat* in de plant voorkomt. Volgens hem zou *calciumpectaat* pas door eene chemische omzetting uit de in de planten voorkomende pectinestoffen kunnen ontstaan. MULDER was het ook, die de meening uitsprak, dat de pectine bij het koken van vruchten uit eene nog onbekende „incrusteerende” stof ontstond. Hij stelde zich voor, dat de pectine in het plantenweefsel er voor moest zorg dragen, dat cellulose in suiker werd omgezet, op grond van zijne waarneming, dat de pectine het veelvuldigst daar in de plant voorkwam, waar de meeste suikers waren opgehoopt.

Andere onderzoekers wijdden zich meer aan de analyse van de pectine, die zij als een „einheitliche” stof beschouwden. Ze trachtten de pectinezure zouten van de zware metalen te bereiden en leidden hieruit formule's voor de pectine af, die groote onderlinge afwijkingen vertoonen. Deze afwijkingen moeten grootendeels geweten worden aan de onzuiverheid van de pectinepreparaten, waarmede gewerkt werd.

Eenigen kwamen tot de overtuiging, dat de pectine niet als koolhydraat mocht worden beschouwd, daar ze hiervoor te zuurstofrijk was. Over het algemeen echter hebben de onderzoekingen uit dien tijd tot de grootste verwarringen aanleiding gegeven en hebben ze onze kennis der pectinestoffen niet veel verder gebracht.

§ 2. De onderzoekingen van FRÉMY.

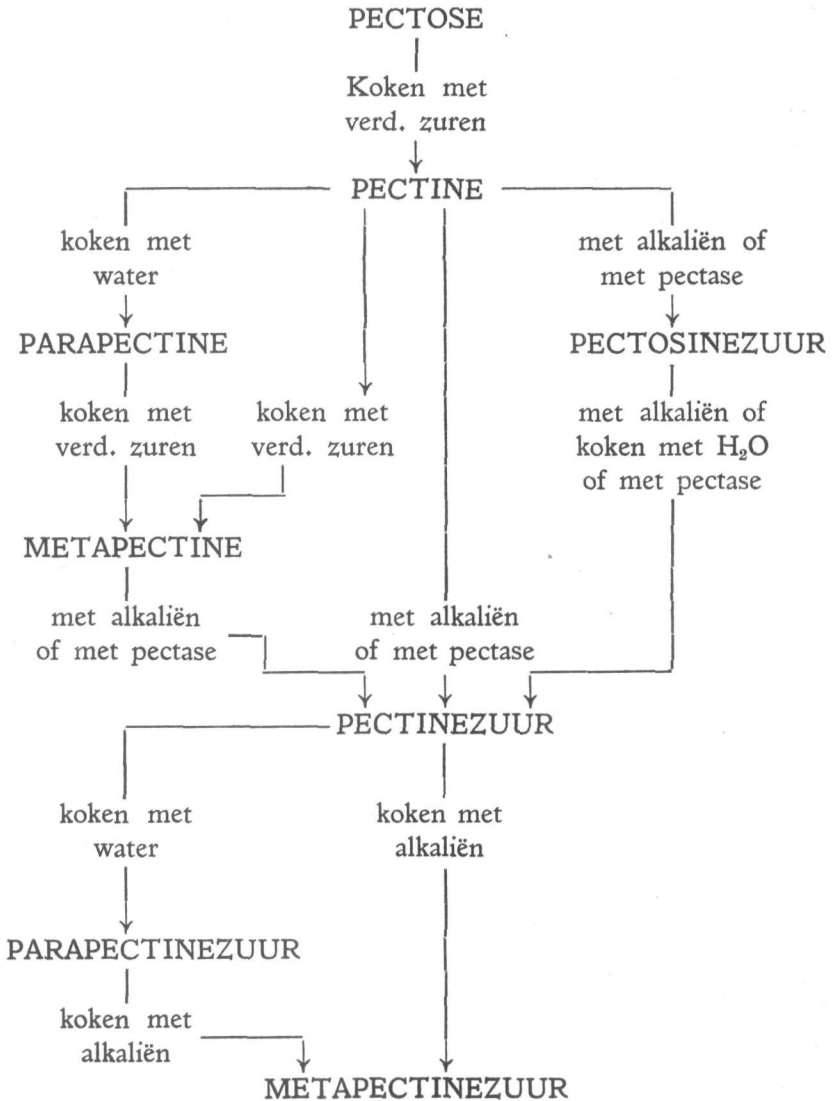
Na BRACONNOT kwam EDMOND FRÉMY³⁾ in 1840 met een reeks onderzoekingen, welke van zoo groot belang zijn geweest, dat er

¹⁾ A. PAYEN, Journ. de Pharm. 28, pag. 20 (1840); Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 43, pag. 769, (1856).

²⁾ G. J. MULDER, Pogg. Ann. d. Phys. u. Chem. 44, pag. 432, (1838); Berz. Jahresber. phys. Wiss. 48, pag. 283, (1839).

³⁾ E. FRÉMY, Ann. der Chemie 35, pag. 318, (1840); Ibid. 67, pag. 257, (1848); Journ. de Pharm. 26, pag. 368, (1840). Ann. de Chimie et de Phys. 24, pag. 5, (1848).

zelfs heden ten dage nog dikwijls naar zijne werken kan worden verwezen. Vooral zijn beschrijving van de omzettingen, welke optreden bij het rijpen van vruchten is ook thans nog alleszins het lezen waard. In onderstaand schema heb ik weergegeven, op welke wijze de verschillende pectinestoffen van FRÉMY met elkaar in verband staan en hoe ze, volgens dezen onderzoeker, uit elkaar kunnen ontstaan.



FRÉMY leidde de formule's van zijne verschillende pectinestoffen af uit de analyse van de loodzouten der verschillende verbindingen.

De *pectose* zou volgens FRÉMY eene in water, alcohol en aether onoplosbare stof zijn, die bijna altijd de cellulose in het plantenweefsel begeleidt. Zij komt hoofdzakelijk in onrijpe vruchten en wortelen voor en zou door reagentia niet zonder ontleding van cellulose te scheiden zijn, maar door een gelijktijdigen invloed van zuren en warmte zou ze overgaan in eene stof, die in water oplosbaar is, de *pectine*. Azijnzuur zou waarschijnlijk het eenige zuur zijn, dat de *pectose* onaangetast laat.

Dat de *pectose* geen onoplosbare verbinding van *pectine* met kalk zou zijn, meende hij te hebben bewezen, doordat hij had gevonden, dat *pectine*, noch met kalk, noch met eenig kalkzout eene onoplosbare verbinding kon vormen, zonder eene volledige verandering te ondergaan. Bovendien wees FRÉMY er op, dat, bij digereeren van onrijpe vruchten en wortelen met geconcentreerd zoutzuur in de koude gedurende vele dagen, er slechts zeer weinig *pectine* in de extractievloeistof was aan te toonen. Indien de *pectine* in den vorm van een onoplosbaar calcium-zout aanwezig was geweest, had ze, volgens FRÉMY, door zoutzuur vrij gemaakt moeten worden, en in de vloeistof moeten oplossen. Kookte hij de vruchten evenwel met zwak aangezuurd water gedurende slechts enkele minuten, dan werd de *pectose* wel in *pectine* omgezet.

Pectose was ook, volgens FRÉMY, de oorzaak van de hardheid van de onrijpe vrucht. Bij het rijpen zou door gelijktijdige inwerking van zuur en eene hogere temperatuur de oplosbare *pectine* ontstaan en de vrucht zacht worden.

Hij wees er verder nadrukkelijk op, dat er tusschen *pectose* en cellulose, in chemisch opzicht, geen enkel verband bestond.

Na de ontdekking van SCHWEIZER, dat koperoxydammoniak een oplosmiddel was voor cellulose, nam FRÉMY nog waar, dat van de celwanden de cellulose in koperoxydammoniak oploste, terwijl *pectose* daarentegen er een onoplosbaar koperpectaat mee vormde.

De *pectine* komt volgens FRÉMY slechts dan in de vruchten voor, als er al reeds eene rijping heeft plaats gehad. De *pectine* ontstaat, als de vruchten aan warmte blootstaan en hare vorming is dan een gevolg van de inwerking van citroenzuur en appelzuur uit de vrucht op *pectose*. Dit trachtte hij aannemelijk te maken, door onrijpe

vruchten uit te persen: het sap bevatte dan geen pectine, doch wel was dit het geval, wanneer hij het vruchtvleesch met het sap opkookte, waarbij de vloeistof duidelijk visceus werd.

FRÉMY gaf voor de bereiding van eene zeer zuivere pectine de volgende werkwijze aan:

Het sap van zeer rijpe peren wordt koud uitgeperst en daarna gefiltreerd. Met oxaalzuur wordt het calcium er uit neergeslagen en de eiwitten worden met eene geconcentreerde oplossing van looizuur verwijderd. De vloeistof wordt vervolgens met alcohol behandeld, waarbij de pectine in lange, geleachtige draden neerslaat. Deze pectine wordt met alcohol gewasschen, daarna in koud water opgelost en nog eens neergeslagen met alcohol. Ditzelfde wordt drie tot vier maal herhaald, tot er geen suikers en organische zuren meer in de boven het neerslag staande vloeistof zijn aan te toonen.

De zoo verkregen neutrale pectine is volkomen kleurloos, bevat 1 % asch, is niet kristalliseerbaar, geeft met basisch loodacetaat een neerslag, met neutraal loodacetaat daarentegen niet.

Alkaliën zetten de pectine oogenblikkelijk in oplosbare pectinezuren zouten om, waaruit dan bij behandeling met zuren het onoplosbare pectinezuur weer werd verkregen. Dit gedrag was zóó karakteristiek, dat FRÉMY zich niet kon voorstellen, dat sommige schrijvers de pectine met gommen of plantenslijmen konden verwarren.

Eene belangrijke ontdekking was het van FRÉMY, toen hij een enzyme in verschillende plantensappen wist aan te toonen, dat in staat was om pectine-oplossingen te coaguleeren. Dit enzyme, de *pectase*, zooals FRÉMY het noemde, maakte bij korte inwerking uit pectine een zuur, dat hij pectosinezuur noemde en dat bij langere inwerking ook pectinezuur opleverde¹⁾.

Door zuren wordt volgens FRÉMY uit pectine *metapectine* gevormd; door koken met water *parapectine*, terwijl parapectine op haar beurt in metapectine kan overgaan door koken met verdunde zuren. Beide pectinestoffen gaan met alkaliën weer in pectinezuur over. (Men zie voor deze omzettingen het schema op blz. 20).

Opgemerkt moge nog worden, dat het belangrijkste verschil tusschen de pectine en de parapectine van FRÉMY hierin gelegen is, dat de eerste verbinding niet, de tweede wel met neutraal loodacetaat neerslaat, terwijl tenslotte de metapectine door haar meer

¹⁾ Op de pectase zal in Hoofdstuk VI uitvoerig worden teruggekomen.

geprononceerd zuur karakter en de eigenschap, om met barium-chloride neer te slaan, zich van de beide eerstgenoemde verbindingen onderscheidt.

FRÉMY vroeg zich af, of ook het *pectinezuur* reeds als zoodanig in het weefsel voorkwam. Om dit aan te toonen, kookte hij wortelen (*Daucus Carota L.*) zeer lang uit met verdund zuur, zoodat alle pectine en pectose er uit geëxtraheerd waren. Behandelde hij daarna de wortelen met loog, dan kon hij bij oude wortelen dikwijls betrekkelijk groote hoeveelheden pectinezuur nog in oplossing brengen als natrium-pectaat, terwijl dit bij jonge wortelen in veel mindere mate het geval was. Dit wees er dus op, dat bij het ouder worden der wortelen een deel der pectine reeds in pectinezuur wordt omgezet.

Pectinezuur is volgens FRÉMY onoplosbaar in koud water en weinig oplosbaar in kokend water. Het lost reeds in zeer verdunde alkali op en verder in vele neutrale zoutoplossingen.

Kookte hij pectinezuur lang met water, dan loste het tenslotte toch op en hij noemde dit oplosbare zuur dan *parapectinezuur*.

FRÉMY spreekt behalve van *parapectinezuur* en *pectinezuur* nog van *pectosinezuur*, *metapectinezuur* en *pyropectinezuur*.

Pectosinezuur, dat in koud water moeilijk oplosbaar is, zou de stof zijn, die bij korte inwerking van pectase op pectine kan ontstaan. Het verschil tusschen pectosinezuur en pectinezuur is, dat het eerste zuur direct in kokend water oplost, welke oplossing dan bij afkoeling tot een gelei stolt. Bij aanwezigheid van zuren is het pectosinezuur onoplosbaar.

Parapectinezuur ontstaat bij inwerking van kokend water op pectinezuur. Het reduceert FEHLING's proefvocht.

Metapectinezuur ontstaat uit parapectinezuur, als men dit in oplossing eenigen tijd laat staan. Het gedraagt zich anders t.o.v. barytwater als parapectinezuur, reduceert evenwel ook FEHLING's proefvocht.

FRÉMY had deze laatste beide zuren zorgvuldig van suikers bevrijd door er de lood-zouten of calcium-zouten van te maken en hieruit dan de zuren weer te bereiden. Desniettemin reduceerden de aldus gezuiverde zuren FEHLING's proefvocht nog sterk.

Metapectinezuur kon volgens FRÉMY ook nog op vele andere wijzen ontstaan. Met overmaat kaliloog of natronloog ontstond uit pectine, uit pectosinezuur of uit pectinezuur ook metapectinezuur. Verder ontstond het nog, als men eene pectineoplossing aan

zichzelf overliet, waarbij intusschen waarschijnlijk wel microbenwerking in het spel zal zijn geweest. De oplossing verloor dan de eigenschap, dat ze met alcohol neergeslagen kon worden.

Pyropectinezuur zou ontstaan door verhitting van alle pectine-stoffen bij 200° C., waarbij CO₂ en H₂O ontweken en eene zwarte stof achter bleef, die zuur reageerde en in water oplosbaar was.

In het kort kan het rijpen van de vruchten in verband met de kennis van de pectinestoffen volgens FRÉMY als volgt worden beschreven:

Onrijpe vruchten zijn gewoonlijk hard en de cellen zijn ondoorzichtig. De vaste stof, die zich in de celwanden van onrijpe vruchten bevindt, is pectose naast cellulose. In den warmen tijd wordt nu, door gelijktijdige inwerking van warmte en zuren uit de vruchten, de pectose omgezet in pectine. De vruchten worden dan week, de cellen worden doorzichtig. De smaak van de vrucht wordt zachter, doordat deze, bij het rijpen zich ontwikkelende, pectine door hare viscositeit de smaak maskeert van de zuren, die in vrijen toestand in de vrucht aanwezig zijn.

De pectine, die in deze rijpe vruchten aanwezig is, zet zich nu verder volgens FRÉMY gemakkelijk om in metapectinezuur, dat een vrij sterk zuur is. Nu meent hij verder te hebben waargenomen, dat vele onrijpe vruchten, b.v. appels, groote hoeveelheden zetmeel bevatten en dat dit gedurende het rijpen van den appel onder den invloed van zuren in suikers wordt omgezet. Als nu in eene vrucht niet veel zuur aanwezig is, dan zou de pectine volgens FRÉMY het noodige zuur, in den vorm van metapectinezuur kunnen leveren, om het zetmeel in suiker om te zetten.

Uit al het voorafgaande trekt FRÉMY de conclusie, dat pectine-stoffen zeer veranderlijk zijn: eerst zijn ze vast en geven aan de cellen stevigheid; later zijn ze gomachtig en maskeeren den smaak der in de vruchten aanwezige zuren, en eindelijk kunnen ze zich in sterke zuren omzetten, welke een rol spelen bij de omzetting van het zetmeel in suikers.

§ 3. De verdere tot 1900 verrichte onderzoekingen omtrent de chemie van de pectinestoffen.

Eene belangrijke waarneming deed SCHEIBLER¹⁾, toen hij in

¹⁾ C. SCHEIBLER, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 1, pag. 59, 108, (1868); Ibid. 6, pag. 612, (1873). Neue Zft. f. Rüb. Zuck. Ind. 3, pag. 341, (1879); Ibid. 21, pag. 325, (1888).

1868, uit bietensnijdsels bereid, metapectinezuur met zuur kookte. Daarbij verkreeg hij een reduceerende suiker en een sterk zuur, zoodat dus het metapectinezuur als eene soort glucoside was te beschouwen. De suiker, die hij verkreeg, noemde hij *pectinose*. Later bleek het SCHEIBLER, dat zijn *pectinose* identiek was met *arabinose*, die men uit arabische gom kon verkrijgen en dat *metapectinezuur* hetzelfde was als *arabinezuur*.

Sedert deze vondst van SCHEIBLER is door vele onderzoekers arabinose als hydrolyseproduct van pectine van verschillende herkomst verkregen.

WOHL en VON NIESSEN¹⁾ verrichtten in 1889 nadere onderzoekingen omtrent het gedrag der pectinestoffen in de bietsuikerfabricage. Zij toonden bij de suikerbieten aan, dat reeds door koken met water de pectinestoffen in eene oplosbare modificatie werden omgezet. Door eene verhitting van 30 uren met water kon 33 % van de droge stof van bieten in oplossing worden gebracht en bij toevoeging van zeer verdund oxaalzuur kon men reeds na 4 uren koken 45 % extraheeren.

In beide gevallen ging dezelfde stof in oplossing. Bij hydrolyse leverde de zoo verkregen pectinestof arabinose en door oxydatie met salpeterzuur verkreeg hij eene hoeveelheid *slimzuur*, die 13 % bedroeg van de droge stof. Deze uitkomsten wijzen op een hoog gehalte aan *galactose*-verbindingen in de pectinestoffen en deze onderzoekers kunnen dus als de ontdekkers van een tweeden bouwsteen van sommige pectinestoffen: de *galactose* worden beschouwd.

HERZFELD²⁾ bevestigde bovenstaande onderzoekingen en vond bij oxydatie van pectinestoffen slimzuur en bij koken met zoutzuur furfurol. Hij trachtte hiermede het feit te verklaren, dat pectineoplossingen nu eens linksdraaiend en dan weer rechtsdraaiend werden gevonden. De arabinose-component van de pectine draait links, de galactose-component rechts. Deze twee stoffen zouden nu in verschillende verhouding in pectinen van verschillenden oorsprong voorkomen.

¹⁾ A. WOHL und K. VON NIESSEN, D. Zft. f. Rüb. Zuck. Ind. 26, pag. 924, (1889); Neue Zft. f. Rüb. Zuck. Ind. 39, pag. 655, 924, (1897).

²⁾ A. HERZFELD, D. Zft. Zuck. Ind., pag. 295, 667, (1891); Ibid. pag. 173, (1893).

TROMP DE HAAS en TOLLENS¹⁾ onderzochten de samenstelling van het pectinemolecuul opnieuw. Zij hadden opgemerkt, dat pectinestoffen dikwijls zuur reageeren in tegenstelling met plantenslijmen, die altijd neutraal zijn. Plantenslijmen zouden volgens deze onderzoekers waterstof en zuurstof in dezelfde verhouding als water bevatten en zij beschouwen die slijmen dan ook als koolhydraten.

Voor de pectinestoffen werd meestal de gewichtsverhouding van waterstof en zuurstof niet als 1 : 8 gevonden. De onderzoekers bereidden uit allerhande vruchtensoorten pectine op verschillende manieren, n.l. door koudwaterextractie, door warmwaterextractie en door extractie met verdund zuur, waarna gefiltreerd werd en neergeslagen met alcohol. Zij vonden gewichtsverhoudingen van waterstof en zuurstof, die wisselen van 1 : 8,4 tot 1 : 7,4. Eenzelfde vrucht gaf dikwijls verschillende waarden, naar gelang het sap één of meer malen met alcohol was neergeslagen.

De pectine zou dus wel zeer na verwant zijn aan de koolhydraten. TOLLENS¹⁾ vermoedde evenwel, dat er een geringe overmaat aan zuurstof aanwezig is en dat in het molecule naast koolhydraatgroepen, één of meer carboxylgroepen voorkomen, die somtijds anhydriden of esters vormen. De oorspronkelijke pectine zou dientengevolge neutraal kunnen zijn.

Wordt de pectine evenwel met alkaliën behandeld, dan zou eerst de anhydriedbinding verbroken worden en de pectine als pectinezuur worden opgelost. Bij hydrolyse zou het molecuul, onder afsplitsing van arabinose, galactose, xylose of andere suikers, afgebroken worden, waarbij ook zuren zouden ontstaan.

§ 4. De onderzoekingen der laatste jaren.

a. VON FELLEBERG.

Wat het chemisch onderzoek aangaat zijn de laatste tien jaren van groot belang geworden voor de oplossing van het vraagstuk van de constitutie der pectine. Als eerste zeer belangrijke vondst moet dan worden genoemd die van VON FELLEBERG²⁾, die er in slaagde aan te toonen, dat in de pectine belangrijke hoeveelheden methylalcohol in veresterden toestand voorkomen.

¹⁾ R. W. TROMP DE HAAS und B. TOLLENS, Ann. der Chemie und Pharmacie 286, pag. 278, (1895).

B. TOLLENS, Handbuch der Kohlenhydraten, pag. 251, (1898).

²⁾ TH. VON FELLEBERG, Bioch. Zft. 85, pag. 118, (1917).

Naar aanleiding van waarnemingen van WOLFF¹⁾, dat in het sap van vele vruchten een weinig methylalcohol voorkwam en dat dit gehalte aan methylalcohol bij een gisting der sappen tot $\pm 1\%$ van de totale hoeveelheid alcohol kon toenemen, onderzocht von FELLEBERG²⁾ eenige brandewijnsoorten en vond daarin duidelijk aantoonbare hoeveelheden van bovengenoemden alcohol. Tschirch, in wiens laboratorium hij werkte, wees hem er op, dat de moederstof van dezen methylalcohol in de allereerste plaats onder de celwandbestanddeelen moest worden gezocht. Na deze aanwijzing van Tschirch onderzocht von FELLEBERG de droge membranen van de verschillende vruchten en kon hieruit concludeeren, dat de methylalcohol van de „brandewijnsoorten” haar oorsprong had in de pectinstoffen der vruchten. Het was hem niet mogelijk uit cellulose, hemicellulose, verschillende plantenslijmen, suberine en nog vele andere celwandstoffen, methylalcohol af te splitsen. Bij tragacanth gelukte dit evenwel zeer goed, terwijl ook met lignine uit beuken- en eikenhout een zeer geringe methylalcohol-reactie was te verkrijgen. Het bleek hem verder, dat de pectine een methylester moest zijn, daar de methylalcohol gemakkelijk kon worden afgesplitst en de pectinstof daardoor in zuurgraad toenam. Dit maakte het voor hem noodzakelijk om eene methode uit te werken, voor de bepaling van kleine hoeveelheden methylalcohol. Hij slaagde er in de quantitative methode van DENIGÈS te verbeteren, terwijl hij tevens eene werkwijze aangaf, volgens welke de methylalcohol quantitatief uit de pectinen kon worden afgesplitst.

Verder werd de methode nog geschikt gemaakt voor de bepaling van vasten, als aether gebonden, methylalcohol uit lignine. Deze werkwijze heeft volgens von FELLEBERG dit voordeel boven de bepalingmethode van ZEISEL, dat ze niet willekeurig de geheele hoeveelheid methylalcohol bepaalt, maar dat men eene scheiding kan verkrijgen tusschen vrijen, veresterden en veraetherden methylalcohol. De reactie van DENIGÈS berust hierop, dat de methylalcohol tot formaldehyde wordt geoxydeerd en dat dit aldehyde met fuchsine-zwaveligzuur een meer of minder blauwe of violethroode kleuring geeft. Om de werking van het tegelijkertijd optredende aceetaldehyde, dat uit den aethylalcohol ontstaat, uit te schakelen, wordt in eene betrekkelijk zure oplossing gewerkt. Zuivere aethylalcohol geeft

¹⁾ J. WOLFF, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc., 131, pag. 1323, (1900).

²⁾ TH. VON FELLEBERG, Bioch. Zft. 85, pag. 45, (1917).

slechts eene zwak-gele verkleuring, die ontstaat door het fuchsine-zwaveligzuur.

Hoogere alcoholen werden ook volgens deze methode geprobeerd, en het bleek VON FELLEBERG, dat isobutylalcohol en amylalcohol zeer lichte kleuringen gaven, die wel te verwaarloozen zijn, terwijl propylalcohol in het geheel geen reactie gaf. Voorts moet er rekening mee worden gehouden, dat glycerine en wellicht nog enkele andere organische stoffen bij oxydatie met permanganaat ook wel geringe hoeveelheden formaldehyde opleveren. Een ernstig bezwaar levert dit intusschen niet op, daar de reactie op den methylalcohol toch steeds geschiedt in een op de eerder aangeduide wijze, uit de pectine-stoffen verkregen destillaat.

Het gehalte aan methylalcohol in de pectinestoffen is vrij groot. Maximaal werd 11,5 % gevonden. Pectine laat zich volgens VON FELLEBERG niet alleen door verdund zwavelzuur verzeepen, maar nog veel gemakkelijker door natronloog. Voegt men aan eene pectine-oplossing slechts een geringe overmaat verdunde natronloog toe, dan is reeds na 2 minuten alle methylalcohol afgesplitst. In dit opzicht onderscheidt zich de pectine scherp van lignine, het meest verspreide methoxylderivaat, dat tegen kokende sterke loog bestendig is. VON FELLEBERG verbeterde de bepaling van DENIGÈS door o. a. den tijdsduur van de inwerking van het permanganaat te veranderen en verder door de toe te voegen hoeveelheid permanganaat te vermeerderen. Het bleek VON FELLEBERG verder, dat de toevoeging van een weinig aethylalcohol de intensiteit van de kleur verhoogde, daar volgens DENIGÈS dan intermediair *formol-acetol* wordt gevormd, dat gemakkelijker met fuchsinezwaveligzuur reageert dan formaldehyde. Na toevoeging van 1 cc. 10 %-igen alcohol werd er een ruim 2 maal zoo sterke kleur verkregen. Hij verbeterde verder de verhouding van het SO_2 - en fuchsinepercentage. Het beste resultaat voor de kleurstofvorming leverde eene oplossing, die 3 gr. mol. SO_2 bij 5 gr. fuchsine per L. bevatte. Hij kreeg op deze wijze een ongeveer tweemaal zoo sterke kleur als met de oorspronkelijke oplossing van DENIGÈS.

VON FELLEBERG maakt onderscheid tusschen de volgende pectinestoffen:

- 1e. de *protopectine* of *pectose*.
- 2e. de *pectine*, waaronder hij het volledig veresterde pectinezuur

verstaat, alsmede alle methylalcohol-armere overgangproducten tot aan het pectinezuur.

3e. het pectinezuur.

Hij deed verder proeven om uit te maken, in hoever een uit appels bereide ruwe protopectine een calcium-zout was of niet. De grootste hoeveelheid calcium bleek aan VON FELLEBERG reeds in koud azijnzuur op te lossen. Koud azijnzuur ontleedt echter protopectine niet, zoodat deze aldus geëxtraheerde calcium geen deel uitmaakt van de protopectine. Na de behandeling met azijnzuur bracht hij het materiaal in verdund, koud zoutzuur, waarbij andermaal wat calcium in oplossing bleek te gaan. Tenslotte had er nog eene warme extractie met zoutzuur plaats, waarbij nog 2,3 à 3,6 % calcium oploste. Deze laatste hoeveelheid calcium kan aan pectine gebonden voorkomen. Maar, daar het op geen enkele manier gelukt, zuivere protopectine af te scheiden, zijn wij volgens VON FELLEBERG voor een groot gedeelte op vermoedens aangewezen. Waarschijnlijk zouden wij bij de omzetting van protopectine in pectine met eene hydrolytische splitsing te maken hebben. Pectine zou als anhydride aanwezig kunnen zijn, of wellicht ook gebonden aan eene andere stof, b.v. cellulose. Bij verhitting met verdund zuur zou er eene hydrolytische splitsing optreden, onder vorming van oplosbare pectine. Men zou volgens VON FELLEBERG ook aan een glycoside kunnen denken, daar FRÉMY bij den overgang van pectose in pectine ook al aanwijzingen meende te hebben gevonden, dat er suikers werden gevormd. VON FELLEBERG heeft echter bij appels niet kunnen aantoonen, dat er een suiker vrijkwam bij de omzetting van protopectine in pectine.

Voor de bereiding van *pectine* beveelt VON FELLEBERG de door BOURQUELOT en HÉRISSEY ¹⁾ aangegeven methode aan, welke hierop neerkomt, dat alle in alcohol oplosbare bestanddeelen eerst door extractie met alcohol worden verwijderd, vervolgens het weefsel met water onder druk wordt verhit en de gefiltreerde oplossing daarna met zoutzuurhoudenden alcohol wordt neergeslagen.

VON FELLEBERG meent te moeten aannemen, dat er in de appelpectine, een methylpentose aanwezig is, daar men bij de pentosebepaling volgens TOLLENS een phloroglucideneerslag verkrijgt, dat gedeeltelijk in alcohol oplosbaar is met bruine kleur.

¹⁾ E. BOURQUELOT et H. HÉRISSEY, Journ. de Pharm. et de Chim. 7, pag. 473, (1898)

Hij meende de volgende formule aan de pectine te mogen toekennen:



waarbij n alle waarden van 0 tot 8 kan aannemen.

De pectinen uit verschillende vruchten kunnen volgens VON FELLEBERG ook een zeer verschillend methylalcoholgehalte hebben. Bij vermindering van het methylalcoholgehalte nemen de viscositeit en de oplosbaarheid in water af en de zuurgraad toe. Verder beschouwt VON FELLEBERG de *parapectine* en de *metapectine* en het *pectinezuur* van FRÉMY als verschillend hoog gemethoxyleerde pectinezuren.

De pectinesoorten van verschillende herkomst zullen volgens VON FELLEBERG veelal ook in ander opzicht verschillen in samenstelling. Het lijkt hem zeer waarschijnlijk, dat bietenpectine verschilt van vruchtenpectine; het pectinezuur van bieten toch is beter oplosbaar in water dan dat van vruchten.

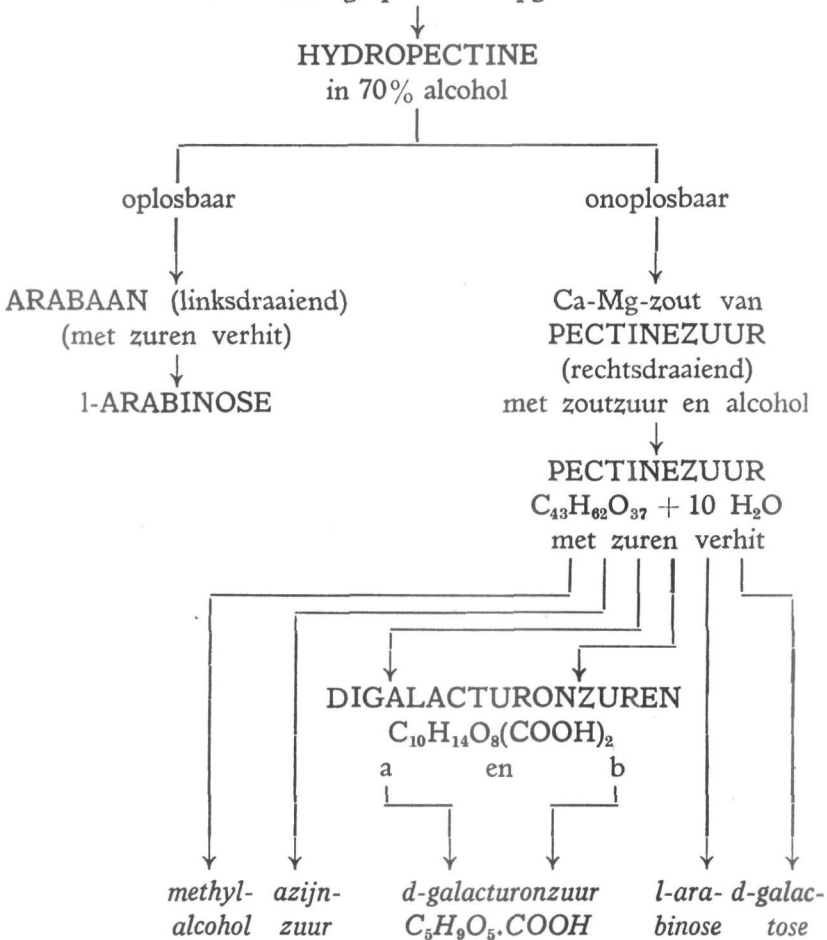
De alkalipectaten zijn volgens VON FELLEBERG in water eenigszins oplosbaar en met alkalizouten kan men ze volgens VON FELLEBERG uit de waterige oplossing neerslaan. De aardalkalipectaten worden gevormd door de aardalkalihydroxyden aan pectine of pectinezuur toe te voegen. Zure pectaten kan men verkrijgen door pectinezuur met metaalzouten neer te slaan.

b. EHRLICH.

Zeer belangrijke nieuwe gezichtspunten danken wij voorts aan F. EHRLICH. Hij werkte met de pectinestoffen uit suikerbieten en past voor zijne pectinestoffen een heel ander systeem van namen toe, welke door hem in samenwerking met R. VON SOMMERFELD¹⁾ in onderstaande tabel wordt weergegeven:

¹⁾ F. EHRLICH und R. VON SOMMERFELD, Bioch. Zft., 168, pag. 263, (1926).

BIETENPECTINE in koud water onoplosbaar, door warm water gesplitst en opgelost als:

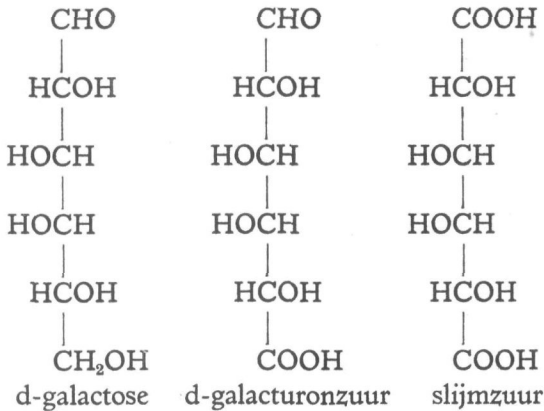


In 1917 ontdekte EHRlich ¹⁾ als bestanddeel van de pectinstoffen uit suikerbieten het d-galacturonzuur, een isomeer van d-glucuronzuur. Het was tot dusver nog niet uit plantenmateriaal afgescheiden en was alleen bekend als reductieproduct van slijmzuur: het *aldehyd-slijmzuur*. Het gelukte EHRlich dit d-galacturonzuur uit de hydrolyseproducten van pectine als gekristalliseerde stof af te scheiden. Dit product vertoonde volgens EHRlich evenals glucuron-

¹⁾ F. EHRlich, Chem Zeit. 41, pag. 197, (1917).

zuur duidelijk de *pentosereacties*, waaronder de *naphtoresorcinereactie* van TOLLENS. Het d-galacturonzuur gaf, volgens EHRlich¹⁾, bij oxydatie met salpeterzuur, slijmzuur.

Ter verduidelijking volgen hieronder:



Volgens EHRlich is de bereiding van pectine, zooals andere onderzoekers die toepassen, niet goed. Hij heeft opgemerkt, dat, wanneer hij suikerbieten, die te voren van alle suiker zijn bevrijd, met water onder druk uitloogt, en het extract met aangezuurden alcohol neerslaat, er in het alcoholisch filtraat een stof in oplossing blijft, die bij nader onderzoek een anhydride van arabinose blijkt te zijn, welke hij *arabaan* noemt.

EHRlich geeft nu den naam „*pectine*” aan de pectinestof, zooals ze oorspronkelijk in de plant voorkomt. Volgens zijne opvatting moet men aannemen, dat deze „*pectine*” door kokend water zoodanig in oplossing gaat, dat het hydrolytisch, onder wateropname wordt gesplitst in twee verbindingen, die in koud water oplosbaar zijn en welk mengsel hij *hydropectine* noemt. De *hydropectine* uit suikerbieten bleek een mengsel van linksdraaiend *arabaan* en een rechtsdraaiend *Ca-Mg-zout van „pectinezuur”* te zijn. Door extractie met 70%-igen alcohol lieten zich beide verbindingen gemakkelijk scheiden, daar *arabaan* daarin goed oplosbaar is.

Uit het *Ca-Mg-zout van „pectinezuur”* kan men volgens EHRlich het „*pectinezuur*” zelf verkrijgen, door het zout op te lossen in water en het „*pectinezuur*” dan neer te slaan met zoutzuurhoudenden

¹⁾ F. EHRlich, Die Deutsche Zuckerindustrie 49, pag. 1046, (1924).

alcohol. Dit „pectinezuur” van EHRLICH bevat de volgende bouwstenen: methylalcohol, een galacturonzuurcomplex, d-galactose, 1-arabinose en azijnzuur. Het is waarschijnlijk op één lijn te stellen met de aschvrij gemaakte pectine van VON FELLEBERG.

Door eene afsplitsing met alkali of nog beter met verdund zoutzuur, kan EHRLICH uit hydropectine of uit „pectinezuur” polygalacturonzuur verkrijgen, dat FEHLING's proefvocht niet reduceert en een zeer hoog draaiingsvermogen heeft ($\alpha_D = + 273^\circ$ tot $+ 285^\circ$). Het is zeer moeilijk oplosbaar in water en levert met alkali in water oplosbare zouten, met aardalkaliën vaste geleïen. EHRLICH en VON SOMMERFELD denken, dat dit polygalacturonzuur hetzelfde is als het pectinezuur van VON FELLEBERG.

Het polygalacturonzuur bleek hun verder eene combinatie te zijn van een in verdund zoutzuur onoplosbaar digalacturonzuur *a* en een oplosbaar digalacturonzuur *b*. Deze beide verbindingen zijn volgens EHRLICH opgebouwd uit 2 moleculen galacturonzuur, waarbij 2 moleculen water uittreden. Uit beide digalacturonzuren heeft EHRLICH door zure hydrolyse gekristalliseerd d-galacturonzuur verkregen.

Terloops zij opgemerkt, dat deze voorstelling aan waarschijnlijkheid wint, doordat SCHMIDT en VOCKE¹⁾ uit *Fucus serratus* een polyglucuronzuur hebben bereid, dat eveneens eene combinatie bleek van een di-glucuronzuur *a* en een di-glucuronzuur *b*, terwijl deze beide zuren analoge eigenschappen vertoonden met de digalacturonzuren van EHRLICH.

In samenwerking met SCHUBERT heeft EHRLICH²⁾ verder nog een onderzoek verricht over de pectinestoffen van het vlas. Hij kwam tot de conclusie, dat de vlaspectine slechts 3,8 à 4,1 % methoxyl bezat, dus veel minder dan de bietenpectine, die 6 à 9 % methoxyl bevatte.

De hoeveelheid azijnzuur, die in vlaspectine aanwezig was, bleek 8,6 % te zijn, terwijl deze in bietenpectine 11 à 12 % bedroeg.

Hij vond bij de behandeling van vlashydropectine met 70 %-igen alcohol, dat er een hexopentosaan in oplossing ging, dat hij bij zure hydrolyse kon splitsen in 1-xylose, 1-arabinose, d-fructose en d-galactose in tegenstelling weer met de bietenpectine, waarbij

¹⁾ E. SCHMIDT und F. VOCKE, Ber. 59 B, pag. 1585, (1926).

²⁾ F. EHRLICH und F. SCHUBERT, Bioch. Zft. 169, pag. 13, (1926.)

bij deze behandeling alleen arabaan in oplossing ging. Ook het „pectinezuur” had eene andere samenstelling dan het „pectinezuur” der bieten. Het bevatte, behalve den bovengenoemden methylalcohol en het azijnzuur, nog digalacturonzuur *b*, 1-xylose, d-galactose en misschien d-glucuronzuur. Toch is de analogie tusschen deze twee pectinestoffen wel zeer sterk sprekend.

c. Verdere onderzoekingen.

NELSON ¹⁾ betwijfelt de aanwezigheid van azijnzuur in alle pectinen en heeft citroenpectine, appelpectine, tomatenpectine en bietenpectine onderzocht. Hij heeft in de eerste drie soorten geen azijnzuur kunnen aantoonen, in bietenpectine echter 6 %. Voor het verschijnen van NELSON's publicatie, had ook ik reeds citroenpectine met negatief resultaat op de aanwezigheid van azijnzuur onderzocht.

Verder zijn er in de laatste jaren nog tal van andere onderzoekingen over de pectinestoffen verricht.

TUTIN ²⁾ vindt bij het onderzoek van pectine uit appelpulp, die van de ciderfabricage overblijft, dat er bij behandeling met loog, behalve methylalcohol ook nog aceton wordt afgescheiden. Vele onderzoekers hebben dit reeds tegengesproken en ik zelf heb TUTIN's waarneming, bij verwerking van versch materiaal ook niet kunnen bevestigen, zoodat de door dezen onderzoeker genoemde aceton waarschijnlijk bij een gistingsproces door bacteriënwerking zal zijn ontstaan.

SUCHARIPA ³⁾ heeft een tamelijk omvangrijk werk geschreven over de pectinestoffen, waarbij het zwaartepunt weliswaar in de technische toepassing is gelegen, doch waarin tevens een zeer volledig overzicht van de pectineliteratuur tot 1924 wordt gegeven. Hij geeft zelf nog eene nieuwe opvatting betreffende de protopectine.

Hij beschouwt de protopectine niet als eene bepaalde stof, maar als een mengsel van verschillende protopectinen, die alle cellulosehoudend zijn. Theoretisch zijn er volgens hem net zooveel protopectinen mogelijk als de hoogst gemethoxyleerde pectine methoxylgroepen bevat. Om te bewijzen, dat de protopectine eene verbinding is van cellulose met pectine, maakt hij gebruik van eene zeer zuivere

¹⁾ E. K. NELSON, Journ. of the Am. Chem. Soc. 48, pag. 2945, (1926).

²⁾ F. TUTIN, Bioch. J. 15, pag. 494, (1921); Ibid. 17, pag. 83, (1923).

³⁾ R. SUCHARIPA, Die Pektinstoffe, Verlag Dr. Serger und Hempel, Braunschweig, (1925).

pectinegrondstof, namelijk het witte parenchymatische weefsel van de Citroenschillen, dat onder de benaming albedo in den handel wordt gebracht. De schillen worden gemalen, warm geëxtraheerd met alcohol en aether, daarna gedroogd en andermaal gemalen en door de fijnste zeef gezeefd. Het poeder wordt dan in warm gedestilleerd water, dat zwak met zoutzuur is aangezuurd, gebracht. Vrije pectine gaat hierbij evenals calcium-zouten en andere minerale bestanddeelen en zuren in oplossing. Hij laat de massa 5 à 6 uren in het zwakke zuur staan, décanteert en herhaalt deze extractie ongeveer 4 maal, wast met gedestilleerd water na en tenslotte met alcohol. De cellulose wordt nu uit het poeder opgelost door eenige keeren te extraheeren met SCHWEIZER's reagens. Het poeder wordt dan met verdund azijnzuur gewasschen tot er geen sporen van koper meer zijn aan te toonen en het residu, wat hij dan tenslotte achterhoudt, noemt SUCHARIPA *protopectine*. Dat deze protopectine toch weer eene verbinding is van pectine met cellulose, toont hij aan, door ze te extraheeren met oxaalzuur of ammoniumoxalaat. De pectine lost dan gemakkelijk op en het residu is bijna geheel oplosbaar in SCHWEIZER's reagens.

Van protopectine kan SUCHARIPA verschillende fracties verkrijgen met dalend methoxylgehalte. Naarmate deze fracties minder methylalcohol bevatten, wordt de pectine-afsplitsing bezwaarlijker. Iedere afsplitsing van methylalcohol maakt een daarmee overeenkomende hoeveelheid cellulose vrij, die weer in SCHWEIZER's reagens oplosbaar is. Dit bewijst volgens SUCHARIPA, dat de cellulose in het pectine-molecule een of meer methoxylgroepen kan vervangen, waardoor de pectine-cellulose-verbinding ontstaat, die in den celwand als protopectine bestaat.

TUTIN¹⁾ heeft een heel andere beschouwing over de protopectine. Hij heeft appelweefsel onderzocht en weet door malen met behulp van scherp zand, afgewisseld met goed uitwasschen, het na vele malen zoo ver te brengen, dat hij geen pectine meer in oplossing krijgt en ook niet meer in het weefsel kan aantonen. Het lijkt intusschen waarschijnlijk, dat de appels, die TUTIN hierbij gebruikte, reeds te rijp waren en de pectine dus al niet meer als protopectine aanwezig was.

Hiertegenover merkt CARRÉ²⁾ op, dat, als men maar lang genoeg

¹⁾ F. TUTIN, Bioch. J. 17, pag. 510, (1923).

²⁾ M. H. CARRÉ, Bioch. J. 19, pag. 257, (1925).

volhoudt, door koude hydrolyse met gewoon water de protopectine tenslotte volledig in oplosbare pectine zal worden omgezet. CARRÉ heeft dit met vergelijkende proeven aangetoond.

Het is echter heel goed mogelijk, dat de protopectine bij citroenen wel op de een of andere manier eene combinatie is van pectine met cellulose, zooals de protopectine dan bij de bieten volgens EHRLICH eene combinatie van arabaan (d. i. eene hemi-cellulose) met „pectinezuur” is en in het vlas van een hexopentosaan met „pectinezuur”.

Ook SCHRIJVER ¹⁾ en zijne medewerkers zijn tot die opvatting gekomen. Zij noemen de pectinestoffen, zooals ze in de planten voorkomen, *pectinogeen*, d. i. pectinevormer, en vermoeden, dat deze pectinogeen nog op de een of andere manier gebonden is aan een „cytopentaaan”, zooals dat door hen in 1921 is genoemd. Door een extractie van plantenmateriaal met 1N-natronloog, gaat dit cytopentaaan in oplossing en de pectinestoffen blijven neergeslagen, maar verliezen de methoxyl-groep. Dat de pectinestoffen door tamelijk sterke natronloog niet uit het plantenweefsel worden opgelost is ook waargenomen door FARNELL ²⁾, die met suikerriet werkte. Ook HARDY ³⁾ nam hetzelfde waar bij behandeling van citroenschillen, die bevrijd waren van oplosbare pectine, met 1N-natronloog. Het cytopentaaan is volgens SCHRIJVER en NORRIS te beschouwen als eene hemicellulose. Het heeft geen constante samenstelling, kleurt blauw met jodium en reduceert FEHLING's proefvocht niet. Na hydrolyse met zoutzuur reduceert het echter sterk. De pectinestoffen kunnen volgens bovengenoemde schrijvers, na de behandeling met alkali uit het plantenmateriaal verkregen worden met behulp van warm ammonium-oxalaat. Voegen zij aan dit extract zuur toe, dan slaat het „cytopectinezuur” neer. Dit cytopectinezuur komt in zijne eigenschappen wel ongeveer overeen met het pectinezuur van VON FELLEBERG. Volgens SCHRIJVER en NORRIS schijnt de pectinogeen wel in den celwand voor te komen in combinatie met Ca en/of Mg. Het blijkt dan volgens hen ook altijd, dat pectinogeen slechts geëxtraheerd kan worden met die

¹⁾ S. SCHRIJVER and D. HAYNES, *Bioch. J.* 10, pag. 539, (1916).

D. CLAYSON, F. NORRIS and S. SCHRIJVER, *Bioch. J.* 15, pag. 643, (1921).

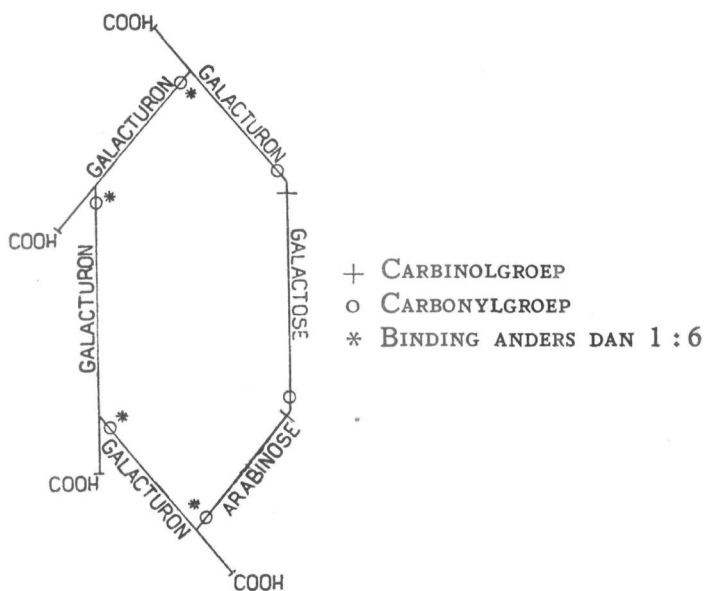
W. NORRIS and S. SCHRIJVER, *Bioch. J.* 19, pag. 676, (1925).

²⁾ R. FARNELL, *Int. Sugar Journ.* 25, pag. 248, (1923); *Ibid.* 25, pag. 630, (1923).

³⁾ F. HARDY, *Bioch. J.* 18, pag. 283, (1924).

reagentia, die een onoplosbaar calciumzout kunnen vormen door eene dubbele omzetting, waardoor de pectinogeen in oplossing gaat. Alkali- en ammonium-oxalaten en oxaalzuur komen hiervoor volgens SCHRIJVER in de allereerste plaats in aanmerking. Ook koolzuur kan groote hoeveelheden pectinogeen vrijmaken. Zouten als keuzout zijn niet in staat deze omzetting teweeg te brengen.

NANJI, PATON en LING ¹⁾ vinden ijzer in de asch van pectinogeen, maar SCHRIJVER en NORRIS gelooven niet, dat dit een essentiël bestanddeel van de pectinestoffen is. NANJI en zijne medewerkers hebben voor het pectinezuurmolecule de volgende schematische voorstelling ontworpen.



Pectinogeen kan volgens NANJI en zijne medewerkers de di- of tri-methylester zijn van deze verbinding, waarbij de overblijvende carboxylgroepen dan nog tot zoutvorming aanleiding kunnen geven. Ook SCHRIJVER en NORRIS achten eene dergelijke samenstelling van het pectinezuurmolecule waarschijnlijk.

¹⁾ D. NANJI, F. PATON and A. LING, Journ. of the Soc. of Chem. Ind. 44, pag. 253 T., (1925).

HOOFDSTUK II.

VROEGERE ONDERZOEKINGEN OVER DE LOCALISATIE EN DE WIJZE VAN VOORKOMEN DER PECTINE- STOFFEN IN DE PLANT.

§ 1. De onderzoekingen van Mangin.

Terwijl in het vorige Hoofdstuk reeds een en ander over de wijze van voorkomen der pectinestoffen in de plant is medegedeeld, zal hier nader worden ingegaan op de onderzoekingen, welke zich meer in het bijzonder hiermede hebben bezig gehouden.

De belangrijkste onderzoekingen op dit gebied hebben wij ongetwijfeld aan MANGIN ¹⁾ te danken. Vóór hem hadden reeds PAYEN, FRÉMY, KABSCH, VOGL, WIESNER e. a. pogingen gedaan, om de localisatie van pectinestoffen in het plantenweefsel na te gaan, maar het is pas aan MANGIN gelukt, om een eenigszins duidelijk beeld te geven van het voorkomen, de wijze van ontstaan en de ontleding der verschillende pectinestoffen in de plant.

Blijkens zijne onderzoekingen komen pectinestoffen zeer algemeen in het plantenrijk voor. De celwand bestaat, zoo schreef hij in 1888, uit twee stoffen, uit cellulose en eene stof, die oplosbaar is in alkaliën, welke laatste stof hij pectose noemde. Later maakte hij nog onderscheid tusschen neutrale en zure pectinestoffen. Tot de neutrale reket MANGIN de pectose en de pectine. De voornaamste zure pectinestoffen zouden het pectinezuur en het metapectinezuur zijn. De eigenschappen van de pectose zijn volgens hem niet scherp vast te stellen, daar men pectose niet van cellulose kan scheiden, zonder dat de pectose eene verandering ondergaat.

Pectose komt volgens MANGIN over de geheele dikte van den celwand verdeeld voor. FRÉMY had reeds ontdekt, dat pectose onoplosbaar was in SCHWEIZER's reagens. MANGIN kon nu aantoonen, dat het mogelijk was een weefsel heelemaal intact te houden, terwijl toch alle cellulose er uit opgelost was. De pectose zou evenwel zeer

¹⁾ L. J. MANGIN, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc., 107, pag. 145, (1888); Ibid. 109 pag. 579, (1889); Ibid. 110 pag. 295, 644, (1890); Ibid. 115, pag. 260, (1892). Journ. de botanique 6, pag. 12, 206, 235, 363, (1892); Ibid. 7, pag. 37, 121, 325, (1893).

gemakkelijk te ontleden zijn, want door de inwerking van koud, verdund zoutzuur zou ze spoedig oplosbaar worden in SCHWEIZER'S reagens.

Pectinezuur zou volgens MANGIN in de celwanden meestal aan aardalkaliën, voornamelijk calcium, gebonden voorkomen. Het is onoplosbaar in water en alcohol en vormt met alkaliën oplosbare zouten, met aardalkaliën onoplosbare zouten. Dat het pectinezuur als calciumzout in de plant voorkomt, toont MANGIN aan, door dunne schijfjes van een pectinehoudend weefsel in zoutzuurhoudenden alcohol te leggen (1 dl. gec. zoutzuur op 3 dln. alcohol). Het calciumpectinaat wordt in calciumchloride omgezet, waarbij het pectinezuur vrij komt. Voegt men na uitwasschen eene verdunde alkalioplossing, ammoniak of een alkalizout (carbonaat, fosfaat, zeep, enz.) toe, dan lost het pectinezuur op en kan men het uit de extractievloeistof met verdund zuur neerslaan.

MANGIN toont verder aan, dat het pectinezure-calcium in de tusschenlamel voorkomt. Hij kon n.l. microscopisch waarnemen, dat wanneer hij een weefsel op bovenstaande wijze had behandeld, de cellen los van elkaar lagen.

Om nu aan te toonen, dat er pectose in een weefsel voorkomt, gaf MANGIN de volgende methode aan. Men brengt de coupe's der te onderzoeken plantenweefsels, om ze calciumpectaat-vrij te maken, in verdund, alcoholisch zoutzuur, daarna in ammoniumoxalaat. De zoo verkregen weefsels worden goed gewasschen en worden eenigen tijd in kalkwater gebracht. Dit maakt namelijk de pectose minder oplosbaar in het SCHWEIZER'S reagens. Dan filtreert men af en brengt het weefsel in koperoxydammoniak. Na inwerking van een paar dagen verdunt men met water, decanteert herhaalde malen en neutraliseert tenslotte met verdund azijnzuur. Het „weefsel”, dat men dan overhoudt, zou volgens MANGIN geen cellulose-reactie's meer vertoonen. Het zou wel de typische kleurreactie's van de pectinestoffen geven, waarover nog nader zal worden gesproken. Met alkaliën kon MANGIN uit dit „weefsel” dan ook alkalipectaat verkrijgen.

De verhouding van de hoeveelheden Ca-pectaat en pectose in de plant, kan volgens MANGIN zeer verschillend zijn. Vooral in krachtig deelende weefsels zal zeer weinig Ca-pectaat voorkomen en veel pectose. Het lijkt MANGIN waarschijnlijk, dat pectose daar aan cellulose gebonden is als eene „celluloside” (analoog aan glu-

coside). Dit cellulocide zal dan gemakkelijk, onder invloed van zuren en alkaliën, in cellulose en pectinezuur worden omgezet. Naarmate nu de weefsels ouder worden en zich de intercellulaire ruimten vormen, zou de hoeveelheid Ca-pectaat sterk toenemen. Het Ca-pectaat kan volgens MANGIN in de intercellulaire ruimten en in de tusschenlamel dikwijls zoo rijkelijk voorkomen, dat het uitstulpingen in den vorm van staafjes of knotsen vertoont, die soms de geheele ruimte kunnen opvullen. Vroeger heeft men wel eens gemeend, deze als intercellulair protoplasma te moeten beschouwen, maar in werkelijkheid bestaat deze formatie volgens MANGIN uit Ca-pectaat. Verschillende botanici hadden deze uitstulpingen, zooals reeds gezegd, vroeger al waargenomen, o. a. LUERSSEN ¹⁾, GARDINER ²⁾, SCHENK ³⁾ en DE BARY, maar niemand kwam op de gedachte, dat dit pectinestoffen konden zijn. LUERSSEN noemt ze een „zwak gecuticulariseerde cellulose”, terwijl DE BARY zeer terecht opmerkte, dat ze geen cellulose-kleurreacties vertoonen. De staafjes worden volgens MANGIN door alle pectinekleurstoffen gekleurd. Na behandeling met verdund zoutzuur en ammoniumoxalaat zijn de staafjes absoluut verdwenen, evenals de tusschenlamel. Enkele van de bovengenoemde onderzoekers namen nog eenige structuur in deze staafjes waar; MANGIN heeft dit echter nimmer kunnen waarnemen.

Voor het kleuren van de pectinestoffen gebruikte MANGIN eerst basische kleurstoffen, zooals: safranine, methyleenblauw, naphthyleenblauw, fuchsine, e. a. in neutrale of zwak zure oplossing.

Later heeft hij het *rutheenrood* ⁴⁾ (ruthenium-sesquichloride) aanbevolen, dat in neutrale of zwak ammoniakale oplossing wordt gebruikt en dat volgens MANGIN het beste kleurreagens is voor pectinestoffen.

Over de samenstelling van den plantaardigen celwand, wist MANGIN nog te vertellen, dat ook de allerjongste celwanden in de groeipunten reeds bestonden uit eene combinatie van cellulose en pectose. Dit kon hij aantoonen, doordat genoemde membranen zoowel de kleurreactie's voor pectinestoffen als die voor cellulose vertoonen. Met koperoxydammoniak kon de cellulose uit een derge-

¹⁾ CHR. LUERSSEN, Bot. Zeit. pag. 641 en 644, (1873).

²⁾ GARDINER, Nature pag. 390, (1885).

³⁾ H. SCHENK, Ber. d. Bot. Ges. 4, pag. 86, (1886).

⁴⁾ L. MANGIN, Comp. rend. de l'Acad. d. Sc. 116, pag. 653, (1893).

lijk weefsel oplossen en waschte hij daarna het weefsel met water en met verdund azijnzuur, dan zag hij, dat zelfs in de jongste weefsels de cellulaire structuur behouden was gebleven.

De zoo behandelde coupe's geven volgens MANGIN geen reactie meer met cellulosekleurstoffen, zeer sterk echter met basische kleurstoffen, hetgeen dus op pectinestoffen zou wijzen. Bij zeer jonge cellen was ook reeds de tusschenlamel aanwezig. Hoewel deze niet microscopisch was waar te nemen, wezen toch volgens MANGIN de reactie's op een niet homogenen celwand. Ook hier komt hij tot de veronderstelling, dat Ca-pectaat de cellen vereenigt.

Bij de deeling van een cel in een vegetatiepunt zal er tusschen de 2 dochtercellen eerst een dun wandje zijn, dat volgens MANGIN óf uitsluitend uit Ca-pectaat kan bestaan óf uit een innig mengsel van cellulose en Ca-pectaat. In het eerste geval zouden zich tegen dit wandje van pectinestoffen onmiddellijk membranen afzetten, die een mengsel zijn van pectose en cellulose, in het tweede geval zou deze wand met eene gelijksoortige stof worden verdikt. Op een gegeven oogenblik zou dan evenwel door een of andere oorzaak midden in dezen wand een laag moeten ontstaan, die uitsluitend uit Ca-pectaat zou bestaan en dus niet dezelfde samenstelling zou hebben als de rest van het membraan, dat cellulosehoudend is.

MANGIN voelt meer voor zijn eerste hypothese, waarop de reactie's ook eerder wijzen. De intercellulaire ruimten zouden dan volgens hem ontstaan, doordat de cellen bij het ouder worden van het weefsel, in plaats van hoekig, rond worden, daar ze beginnen op te zwellen en dus niet meer zoo goed aan elkaar sluiten. Zoo zouden er dan tusschen de cellen ruimten ontstaan. De, door een of andere oorzaak week geworden, tusschenlamelsubstantie zou naar deze intercellulaire ruimten worden geperst en daar o. m. de genoemde zonderlinge vormen van Ca-pectaat-staafjes of -uitstulpingen vormen¹⁾. Volgens MANGIN zou hierbij het protoplasma, dat door den osmotischen druk door het membraan dringt, een rol spelen, doordat dit uit pectose Ca-pectaat zou kunnen vormen en daarbij aanleiding zou geven tot de vorming der eerder genoemde staafjes.

De pectinestoffen zijn door MANGIN ook binnen in de pollenkorrels waargenomen. De intine zou volgens hem voor het grootste

¹⁾ Zie plaat 2, No. 18 en 19, *Narcissus pseudonarcissus*, tegenover pag. 341, in Journ. de botanique 7, (1893).

gedeelte uit pectinestoffen bestaan, in tegenstelling met de gecutini-seerde exine. Ook de pollenmoeder celwanden zouden rijk aan pectinestoffen zijn.

Al deze waarnemingen van MANGIN bewijzen wel, op welk een nauwgezette wijze hij de pectinestoffen in de celwanden heeft bestudeerd. Intusschen moet het waarschijnlijk worden geacht, dat hetgeen MANGIN Ca-pectaat noemt een calciumzout is van eene pectinestof, welke een overgang vormt tusschen MANGIN's pectose en diens pectine. Het calciumzout van MANGIN's pectinezuur toch kan het niet zijn geweest, daar dit onmogelijk kan oplossen, als het lang met water wordt gekookt, hetgeen MANGIN's „Ca-pectaat” wel deed.

§ 2. Voortzetting van het werk van Mangin in de laatste vijf en twintig jaren.

TsCHIRCH behandelt in zijn „Anatomischer Atlas”¹⁾ bij *Sambucus nigra* het proces der „pectinemetamorphose”. Bij *Sambucus nigra* kan TsCHIRCH de pectinemetamorphose zeer goed waarnemen in de membranen van het vruchtvleesch. Hij heeft prachtig gezwollen celwanden waargenomen, vooral binnen in de vrucht. Naar buiten toe neemt deze zwelling af. De pectinemetamorphose heeft hier volgens TsCHIRCH ook waarschijnlijk uitsluitend in de intercellulair-substantie plaats, want men ziet nog wel resten van het secundaire membraan, maar het primaire membraan is nooit meer duidelijk. Eene dergelijke desorganisatie beschreef TsCHIRCH²⁾ al vroeger bij bruin- en roodalgen, waar ook de intercellulair-substantie geheel en de aangrenzende membraanlagen voor een gedeelte verslijmde.

Een leerling van TsCHIRCH, ROSENBERG HEIN³⁾ heeft getracht vast te stellen, of de pectinevorming in morphologisch-anatomisch opzicht bij de vruchten een soortgelijk verschijnsel is als de slijmvorming bij de algen. Het bleek hem, dat dit niet het geval was. De ontledingsproducten waren verschillend en verder bleken de secundaire celwanden bij de pectinevorming intact te blijven, terwijl deze bij de algen sterk opzwoelen.

Hij maakt, evenals MANGIN nog de fout, dat hij de stof, waaruit de tusschenlamel bestaat Ca-pectaat noemt en beweert voorts ten

1) A. TsCHIRCH und Oesterle, Anatomischer Atlas, pag. 45, Tafel XII.

2) A. TsCHIRCH, Angewandte Pflanzenanatomie, pag. 188.

3) E. ROSENBERG HEIN, Diss. Bern. (1908).

onrechte, dat de „geleigevende vruchtenpectine”, welke uit het Ca-pectaat der tusschenlamellen ontstaat, te beschouwen is als eind-product van de geheele rij der pectinestoffen. Uit pectinezuur kan toch door toevoeging van suiker geen gelei worden gevormd.

ROSENBERG wijst er verder op, dat er voor de pectinestoffen tengevolge van hare zeer wisselende samenstelling geen speciaal reagens is te vinden. Voor jonge weefsels kan men gebruik maken van de door MANGIN genoemde kleurmiddelen, welke echter in zeer rijpe en overrijpe vruchten niet meer zouden zijn toe te passen.

Hier past ROSENBERG de door TSCHIRCH aangegeven methode toe, n.l. het oplossen van deze pectinestoffen door middel van eene geconcentreerde suikeroplossing, hetgeen eene karakteristieke eigenschap van de pectinestoffen der rijpe vruchten is, maar wat daarentegen weer niet toe te passen is op pectose.

Door C. GRIEBEL¹⁾ wordt nog een eigenaardig verschijnsel beschreven, waaraan deze auteur den naam van pectolyse geeft. Bij het aansnijden van zeer rijpe vruchten van *Pirus domestica* Smith vertoonen zich aan den rand van een coupe en vooral boven intercellulaire ruimten, eigenaardige „Pektinkugeln”, wanneer men de coupe in water brengt.

Het zijn blaasachtige, kleurlooze massa's, die in water hoe langer hoe grooter worden en de celdoorsnede soms aanzienlijk kunnen overtreffen. Hij meent waargenomen te hebben, dat deze bolletjes een dun huidje hebben. Bij verhitting lossen de bolletjes op en zijn verder aan te tasten met loog, waarbij ze „corrosieverschijnselen” vertoonen. De huidjes zullen volgens GRIEBEL uit eene stof bestaan, die staat tusschen de in water en suikeroplossingen onoplosbare protopectine en de oplosbare pectine van overrijpe vruchten.

De zoo beschreven pectolyse heeft volgens GRIEBEL ook bij andere *Rosaceae*-vruchten plaats.

Verder werden nog zeer uiteenlopende plantendeelen op de aanwezigheid van pectinestoffen onderzocht. A. VIDAL²⁾ vond ze in de wortels van *Equisetum*, TUNMANN³⁾ in de wortels van verschillende *Umbelliferae*.

¹⁾ C. GRIEBEL, Zft. für Unters. der Nahr. und Genussm. 49, pag. 90, (1925).

²⁾ A. VIDAL, Journ. de botanique 10, pag. 236, (1896).

³⁾ O. TUNMANN, Pflanzenmikrochemie, pag. 569, (1913), Berlin.

ROBERTS ¹⁾ nam waar, dat aan de buitenzijde van de wortelharen een laag van pectinestoffen voorkwam, die aan den top verdikt was. CAROLINE HOWE ²⁾ onderzocht naar aanleiding van deze waarneming van ROBERTS de wortelharen van verschillende planten op de aanwezigheid van pectinestoffen. Zij vond bij alle planten, die wortelharen hebben, eene dergelijke pectinelaag aan den buitenkant van de haren, soms in den vorm van Ca-pectaat, maar ook zeer dikwijls als pectose en zij vermoedde in enkele gevallen als pectinezuur. De wortelharen gaven eene zwak zure reactie (pH = 6,8 tot 5,2). Of intusschen deze zure reactie aan de pectinestoffen moet worden toegeschreven, is niet nader door haar bewezen. Cellulose kon niet in de wortelharen worden aangetoond. Dit laatste zou er op wijzen, dat de pectose al vóór de cellulose in een celwand aanwezig kan zijn.

CARRÉ ³⁾ geeft in een reeks onderzoekingen, gedeeltelijk in samenwerking met HAYNES ⁴⁾ of HORNE ⁵⁾ ons een kijk op het gedrag van pectinestoffen in appels en andere plantenweefsels. Zij onderwerpt de jeugdige weefsels aan verschillende chemische bewerkingen en vergelijkt de daarbij intredende veranderingen der pectinestoffen microscopisch met die veranderingen, welke bij de natuurlijke rijping dier weefsels plaats vinden. Het blijkt haar hierbij — en zij documenteert dit met fraaie teekeningen — dat deze laatste veranderingen volkomen zijn te reproduceeren door een behandeling met agentia, die een chemische hydrolyse bewerken. Zij gebruikt rutheenrood voor het kleuren der coupe's en beschouwt dit, evenals MANGIN, als een reagens op alle pectinestoffen.

Ik mag evenwel dit overzicht van de onderzoekingen over de localisatie der pectinestoffen in het plantenweefsel niet besluiten zonder er op te wijzen, dat in de latere jaren verschillende onderzoekers er de aandacht op hebben gevestigd, dat rutheenrood geenszins een streng specifiek kleurreagens op pectinestoffen is.

TUNMANN ⁶⁾ zegt reeds, dat tal van andere stoffen, waaronder ook stikstofhoudende stoffen uit den celinhoud, met rutheen worden

¹⁾ E. A. ROBERTS, Bot. Gaz. 62, pag. 488, (1916).

²⁾ C. G. HOWE, Bot. Gaz. 72, pag. 313, (1921).

³⁾ M. H. CARRÉ, Bioch. J. 16, pag. 704, (1922); Ibid. 19, pag. 257, (1925); Ann. of Bot. 39, pag. 811, (1925).

⁴⁾ M. H. CARRÉ and D. HAYNES, Bioch. J. 16, pag. 60, (1922).

⁵⁾ M. H. CARRÉ and A. S. HORNE, Ann. of Bot. 41, pag. 193, (1927).

⁶⁾ O. TUNMANN, Pflanzenmikrochemie, pag. 564, (1913), Berlin.

gekleurd. Zoo noemt hij in dit verband o. a.: glycogeen en isolichenine, terwijl volgens hem ook de celkern (het chromatine) gekleurd wordt. In tegenwoordigheid van alkaliën worden ook de verhoude celwanden met rutheenrood gekleurd. Zeer goed zou zich dennenhout voor deze kleuring leenen, wanneer het te voren 24 uur in zoutzuurhoudenden alcohol (1 + 3) en daarna 24 uur in ammoniak had gelegen.

Ook TOBLER ¹⁾ heeft reeds deze zelfde verschijnselen opgemerkt ²⁾.

Beide onderzoekers deelen ook mede, dat gomsoorten en plantslijmen door rutheenrood worden gekleurd. Ze denken zich deze twee stoffen ontstaan uit pectinestoffen, wat mijns inziens nog allerminst bewezen is.

Hoe uiteenlopend de chemische samenstelling van de stoffen is, die zich met rutheenrood kunnen kleuren, bewijst wel een door mijzelf waargenomen feit, dat n.l. *tabaschir* (een colloïdaal kiezelzuur, dat soms in de stengels van bepaalde bamboe-soorten boven de knopen voorkomt) na behandeling met rutheenrood en uitwasschen van de overtollige kleurstof, een vrij sterke roodkleuring vertoonde.

Uit het voorgaande moeten we dus wel opmaken, dat er groote voorzichtigheid moet worden betracht bij het trekken van conclusies omtrent de aanwezigheid van pectinestoffen in plantenmateriaal bij kleuren met rutheenrood, maar aan den anderen kant zal, wanneer men met de noodige voorzorgen te werk gaat, in vele gevallen een kleuring met rutheenrood tot de aanwezigheid van pectinestoffen kunnen doen besluiten. Hieraan moge nog worden toegevoegd, dat alle door mij bereide pectinestoffen, vanaf de protopectine tot en met het pectinezuur en zijne zouten een duidelijke kleuring met rutheenrood gaven, hetgeen dus in tegenspraak is met de opgaven van ROSENBERG ³⁾, volgens wien de pectinestoffen, die bij het rijpen van de vruchten ontstaan, weinig of in het geheel geen roodkleuring met het reagens vertoonden.

¹⁾ F. TOBLER, Zeitschrift Wiss. Mikrosk. 23, pag. 182, (1906).

²⁾ Zie verder: J. VON WIESNER, Die Rohstoffe des Pflanzenreichs, Bd. I, pag. 418, (1927).

H. MOLISCH, Mikrochemie der Pflanze, pag. 315, (1913), Jena.

³⁾ E. ROSENBERG HEIN, Diss. Bern. (1908).

HOOFDSTUK III.

HUIDIGE STAND VAN HET VRAAGSTUK DER CHEMISCHE SAMENSTELLING DER PECTINESTOFFEN.

In dit hoofdstuk zal in het kort worden uiteengezet, tot welke opvatting eene kritische bestudeering van de literatuur over de pectinestoffen m. i. moet leiden. Ofschoon er nog steeds vele vragen onbeantwoord zijn gebleven, is er toch in den laatsten tijd wel zooveel tot opheldering gebracht, dat we althans den aard van de verschillende pectinestoffen eenigszins hebben leeren kennen. Om nu de resultaten van de verschillende onderzoekers te kunnen vergelijken, leek het mij wenschelijk, een tabel samen te stellen, waaruit afgelezen kan worden, welke van de, door de verschillende onderzoekers beschreven, pectinestoffen, als identiek mogen worden beschouwd, voor zoover zich dit althans liet nagaan. De onderste horizontale rij namen zijn door mijzelf voor de heele reeks pectinestoffen gekozen en worden in dit proefschrift ook verder gebruikt. In de verticale kolommen zijn de namen geplaatst, die door verschillende schrijvers voor dezelfde stof zijn gebruikt.

In Tabel I zijn nu met de letters *a* tot *g* pectinestoffen met de hieronder weergegeven eigenschappen aangeduid.

a. De in koud water onoplosbare pectinestoffen, zooals ze oorspronkelijk in de plant voorkomen.

b. Het mengsel, dat door voorzichtige hydrolyse (door koken met water of verdund zuur) uit *a* is te verkrijgen.

c. De neutrale, in koud water oplosbare, nog methylalcoholhoudende pectinestof, die met alcohol uit een waterig extract van bepaalde plantenmaterialen (bijv. gerijpte vruchten) is neer te slaan.

d. De zure stof, die uit *c* is te bereiden, door ze met verdund zuur aschvrij te maken (nog methylalcoholhoudend).

e. Eenige tusschenvormen tusschen *d* en *f*, door onvolledige afsplitsing van methylalcohol ontstaan.

f. Het uit *b*, *c*, *d* en *e* met behulp van alkali of pectase door volledige

Sleutel op de door de verschillende onderzoekers gebezigde nomenclatuur der pectigestoffen.

Onderzoekers	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	
BRACONNOT	—	—	pectine	—	—	pectinezuur	—	
FRÉMY	pectose protopectine protopectine	—	pectine	metapectine?	pectosine- zuur?	pectinezuur	metapec- tinezuur?	
MANGIN		—	pectine	pectine	—	pectinezuur	—	
TSCHIRCH		—	pectine	pectine	pectine	pectine (alle CH ₂ OH-hou- dende zure pectinen tot het pectine- zuur)	pectinezuur	—
VON FELLEBERG		—	pectine	pectine	pectine		pectinezuur	—
EHRlich (en medewerkers) .	pectine	hydropectine (mengsel van koolhydraten en neutrale oplosb. pectine)	Ca-Mg-zout van pectine- zuur	pectinezuur	—	polygalactu- ronzuur	galacturon- zuur	
SCHRIJVER (en medewerkers)	pectinogeen gebonden aan Ca en Mg, in losse binding met „cyto- pentaan“	mengsel van Ca-Mg-zout van pectino- geen en „cyto- pentaan“	Ca-Mg-zout van pecti- nogeen	pectinogeen	—	cytopectine- zuur of pectinezuur	—	
NANJI, PATON en LING.								
CARRÉ (en medewerkers)								
SUCHARIPA	protopectine (pectine, ge- bonden aan cellulose in verschillende verhoudingen)	—	neutrale pectine	pectine	pectine (idem als bij VON FELLEBERG)	pectinezuur	—	
TUTIN	pectine (ont- kent bestaan protopectine)	—	pectine	pectine	—	pectinezuur	—	
A. C. SLOEP.	protopectine	„hydropectine“	neutrale pectine	zure pectine	minderwaar- dige pectine	pectinezuur	galacturon- zuur	

methylalcoholafplitsing te verkrijgen zuur, dat onoplosbaar is in water.

g. Het zuur, dat uit alle voorafgaande stoffen ontstaat door voortgezette hydrolyse met verdund zwavelzuur.

Achtereenvolgens zal ik nu hieronder voor de verschillende pectinestoffen nog samenvatten, welke begrippen zich met de door mij gekozen benamingen dekken, waarbij dan nog eventueel de afwijkende inzichten van andere onderzoekers zullen worden aangestipt.

Protopectine.

Wij kunnen ons in de eerste plaats de protopectine denken als eene verbinding van hemi-cellulose, cellulose of mogelijk van lignine, met een Ca-Mg-zout van zure pectine. Deze zure pectine zal verschillend in methylalcohol-gehalte kunnen zijn bij pectinestoffen van verschillenden oorsprong. Ook zullen in dezelfde vrucht dikwijls protopectinen kunnen voorkomen van verschillende samenstelling. De hemi-cellulosen zullen soms uit pentosanen alleen bestaan (arabaan bij suikerbieten, EHRlich en von SOMMERFELD); in andere gevallen hexopentosanen kunnen zijn (zooals EHRlich en SCHUBERT bij vlas vinden). Bij citroenschillen vindt SUCHARIPA, dat de protopectine eene verbinding is van pectine met cellulose, althans met een in koperoxydammoniak oplosbare stof, waaruit wij zouden moeten besluiten, dat in de citroenprotopectine geen hemi-cellulosen aanwezig zijn, daar deze laatste meestal niet in koperoxydammoniak oplosbaar zijn. SCHRIJVER en zijne medewerkers beschouwen de protopectine in appels, uien, koolrapen en andere ook als eene verbinding van het calcium-magnesium-zout van pectinogeen (zie Tabel I) met hemi-cellulosen en ook CARRÉ is dezelfde meening toegedaan.

Oudere opvattingen, o. a. van PAYEN, MANGIN en ROSENBERG, dat protopectine een calciumpectaat zou zijn, zijn uitgesloten, daar zij dan eene stof zou moeten zijn, die achteraan in de reeks der pectinestoffen kwam en die dus den methylalcohol al had verloren, en na behandeling met zuur, waardoor het calciumvrij werd gemaakt, onoplosbaar zou blijven, daar pectinezuur moeilijk oplosbaar is. Evenmin lijkt mij de zienswijze van TUTIN, dat de protopectine in het geheel niet bestaat, aanvaardbaar; het is toch evenzeer denkbaar, dat zooals CARRÉ aanneemt, protopectine bij de voortgezette koudwaterextractie eene hydrolyse ondergaat en eerst daardoor in

pectine wordt omgezet. FRÉMY was van de oudere onderzoekers nog het dichtst bij de waarheid, want hij beschouwde zijne pectose als een calciumzout van pectine. Soms schijnt het, of MANGIN ook deze meening is toegedaan, maar dit is niet altijd goed uit te maken, daar hij toch dikwijls van calciumpectaat spreekt. Toch is ook FRÉMY's zienswijze niet houdbaar, daar ook een dergelijk zout goed in water oplosbaar is, zoodat het aannemen van een binding met andere celwandbestanddeelen welhaast onvermijdelijk is.

„*Hydropectine*”.

Wordt pectinerijk plantenmateriaal, dat van te voren bevrijd is van in alcohol en aether oplosbare stoffen en van suikers, met kokend water geëxtraheerd, dan zal protopectine worden omgezet in pectine en dus in oplossing gaan, waarnaast dan eventueel de hemicellulose, waarmee de pectine in de protopectine gebonden is geweest, eveneens in oplossing kan gaan.

Wordt nu eene dergelijke oplossing ingedampt, dan verkrijgt men eene gelatineuze stof, die door EHRLICH *hydropectine* wordt genoemd en dus feitelijk een mengsel is van hemi-cellulose en pectine en dus niet eene eigenlijke pectinestof is te noemen.

Neutrale pectine.

Met alcohol van 75 % kan men uit eene oplossing van hydropectine, de pectine neerslaan, de stof, die EHRLICH het calciummagnesium-zout van pectinezuur noemt. Ik versta onder „neutrale pectine”, alle op genoemde wijze verkregen neutraal reagerende pectinestoffen, hetzij dat daarin de carboxylgroepen volledig met methylalcohol zijn veresterd, hetzij dat deze ten deele zijn veresterd en voor het overige met Ca of Mg zijn geneutraliseerd. De meeste andere onderzoekers noemen deze stof pectine. SCHRIJVER en zijne medewerkers noemen de pectine: het Ca-Mg-zout van pectinogeen en in navolging van hen gebruiken NANJI, PATON en LING en ook CARRÉ dezen naam. SUCHARIPA noemt eene pectine, die hij door eene gewone lauwwaterextractie van citroenschillen verkrijgt, indien ze neutraal reageert, *neutrale pectine* en beschouwt dit als pectinezuur, waarvan alle carboxylgroepen met methylalcohol zijn veresterd. EHRLICH toont voor zijn Ca-Mg-zout van pectinezuur uit bieten aan, dat in het molecule nog acetylgroepen aanwezig zijn, terwijl NELSON bij verschillende andere pectinesoorten het azijnzuur niet heeft kunnen aantoonen. Ook de aanwezigheid van aceton in het pectinemolecule is twijfelachtig.

Zure pectine.

Een krachtiger bewerking is volgens SUCHARIPA noodig voor het vrijmaken van de pectine uit de protopectine, daar het hier gaat om het verbreken van de verbinding tusschen cellulose en pectine, althans in het geval van de citroenschillen.

Eene pectine, die op deze wijze verkregen wordt, wordt door SUCHARIPA ook nog gewoon pectine genoemd. Wordt nu eene dergelijke pectine, die aschhoudend is, met zoutzuurhoudenden alcohol behandeld, dan verkrijgt men eene pectine, die zuur reageert en nagenoeg aschvrij is. Deze pectinestof wordt door de meeste schrijvers ook nog pectine genoemd. EHRlich noemt deze stof echter pectinezuur, daar ze een zuur karakter heeft, en SCHRIJVER noemt dezelfde stof pectinogeen.

Ik zal hier in dit proefschrift aan dit aschvrij gemaakte pectinepraeparaat den naam *zure pectine* geven, welken naam Prof. VAN ITERSOn mij aanraadde te gebruiken, ter onderscheiding van de neutrale aschhoudende pectine.

De metapectine van FRÉMY is waarschijnlijk eene zure pectine geweest, daar hij ze ook uit pectine bereidde door koken met verdund zuur en uit de metapectine weer pectinezuur was te verkrijgen met alkaliën of pectase. Wel lijkt het mij zeer waarschijnlijk, dat de metapectine reeds een gedeelte van den methylalcohol had verloren, daar het koken met verdund zuur in dit opzicht niet geheel onschadelijk kan worden geacht. De zure pectine is de voornaamste pectinestof voor de geleifabricatie, daar ze met suiker en zuur eene gelei kan geven, waartoe minder „gemethoxyleerde” pectinesoorten minder goed in staat zijn en pectinezuur in het geheel niet meer.

Minderwaardige pectine.

De tusschenvormen tusschen zure pectine en pectinezuur zullen wij dikwijls als zoodanig ontmoeten en ook vaak als aardalkalizouten, daar de hydrolyse van protopectine tot pectine in den regel niet zoo voorzichtig heeft plaats gehad, dat de pectine geheel onaangetast is gebleven. Ook zullen wij, zooals reeds gezegd, volgens SUCHARIPA lager gemethoxyleerde pectinen moeten krijgen, uit protopectine, die rijk aan cellulose is geweest. SCHRIJVER vermoedt, dat er nog een minderwaardig soort pectinogeen bestaat, dat slechts één methoxylgroep bevat per molecule, welke methoxylgroep vaster zou zijn gebonden dan de reeds afgesplitste methoxylgroepen.

Ook het pectosinezuur van FRÉMY zal waarschijnlijk als een

tusschenvorm tusschen zure pectine en pectinezuur moeten worden beschouwd, daar dit pectosinezuur nog wel oplosbaar was in kokend water, niet echter in koud water en door inwerking van pectase of alkaliën in pectinezuur kon worden omgezet.

Pectinezuur.

Wat nu het pectinezuur betreft, dit is wel de pectinestof, waarvan de constitutie het best bekend is. Men kan evenwel nog niet met zekerheid zeggen, of pectinezuur van verschillenden oorsprong dezelfde samenstelling heeft. VON FELLEBERG denkt zich de formule als $C_{62}H_{96}O_{52}(COOH)_8$ te zijn en daar er volgens hem bij de omzetting van pectine in pectinezuur enkel methylalcohol wordt afgesplitst en hij zich de pectine opgebouwd denkt uit 2 moleculen arabinose, 1 molecule van een methylpentose, 1 molecule galactose en 8 moleculen galacturonzure-methylester, is volgens hem het pectinezuur eene dergelijke verbinding, behalve dat dan de 8 moleculen galacturonzure-methylester hun methylalcohol hebben verloren en dus overgegaan zijn in galacturonzuur. De veronderstelling van EHRLICH, dat n.l. het pectinezuur van VON FELLEBERG identiek zou zijn met zijn tetragalacturonzuur is dan ook ongemotiveerd.

NANJI, PATON en LING beschouwen het pectinezuur als eene verbinding van 4 moleculen galacturonzuur, 1 molecule galactose en 1 molecule arabinose, hetgeen ze besluiten uit een koolzuurbepaling en een furfurolbepaling, waarover in Hoofdstuk IV nog nader zal worden gesproken. Hun bewijzen zijn evenwel niet zoo overtuigend, dat wij hunne formule als de juiste zouden willen aanvaarden.

Galacturonzuur.

Wat nu de bouwstenen van het pectinezuur betreft, is het galacturonzuur wel de belangrijkste verbinding. Deze kan uit het pectinezuur verkregen worden door hydrolyse met zwavelzuur gedurende langen tijd. Een aan de opgestelde formules beantwoordende opbrengst aan galacturonzuur bij hydrolyse heeft echter nog niemand kunnen tot stand brengen. Er zullen dus waarschijnlijk bij deze hydrolyse wel nog andere onbekende omzettingen plaats hebben. Het is waarschijnlijk, dat uit het galacturonzuur bij koken met zwavelzuur ook CO_2 -afsplitsing plaats heeft, hetgeen primair arabinosevorming ten gevolge heeft, waaruit dan secundair furfurool wordt gevormd. Het galacturonzuur kunnen we intusschen niet meer onder de pectinestoffen rangschikken, daar het reeds de karakteristieke eigenschappen hiervan mist.

HOOFDSTUK IV.

DE BIJ HET CHEMISCH ONDERZOEK DER PECTINE-STOFFEN TOEGEPASTE BEPALINGSMETHODEN.

§ 1. Inleidende opmerkingen.

Alvorens over te gaan tot een beschrijving van de door mij verrichte proefnemingen ter bereiding van eenige pectinestoffen, lijkt het mij gewenscht een overzicht te geven van de door mij bij het onderzoek dier verbindingen toegepaste chemische bepalingsmethoden.

Na hetgeen daaromtrent in de voorafgaande hoofdstukken is meegedeeld, zal het duidelijk zijn, dat bij den huidige stand van onze kennis der pectinestoffen, zich het chemisch onderzoek voorloopig moest beperken tot het vaststellen der in de verschillende pectinestoffen aanwezige bouwstenen, welke daaruit bij hydrolyse met verdunde zuren ¹⁾ in vrijheid kunnen worden gesteld. Vanzelfsprekend was daarbij het streven er op gericht de afzonderlijke bouwstenen zooveel mogelijk quantitatief te bepalen.

Op grond van het in Hoofdstuk I gegeven overzicht, is nu bij de verschillende pectinestoffen in de eerste plaats rekening te houden met de aanwezigheid van de volgende bouwstenen:

- 1e. galacturonzuur.
- 2e. methylalcohol.
- 3e. galactose.
- 4e. arabinose.
- 5e. azijnzuur.
- 6e. aceton.

Achtereenvolgens zal ik nu de methoden bespreken, welke ons voor het aantoonen resp. de quantitatieve bepaling van deze bouwstenen ten dienste staan. Daarbij mag intusschen niet uit het oog worden verloren, dat in alle gevallen eene afsplitsing dezer compo-

¹⁾ Voor de bepaling van den bouwsteen methylalcohol is gebleken, dat een hydrolyse met behulp van verdunde alkaliën meer aangewezen is.

nenten uit het pectinecomplex vooraf dient te gaan, met dien verstande evenwel, dat deze bewerking somtijds reeds samenvalt met de eigenlijke bepaling van den betreffenden component.

§ 2. Bepaling van galacturonzuur.

Het is een betreuenswaardig feit, dat voor het aantoonen en de quantitative bepaling van dezen belangrijkste bouwsteen der pectinestoffen, geen behoorlijk gefundeerde methoden ter beschikking staan. Dit vindt ongetwijfeld zijn oorzaak in de omstandigheid, dat het galacturonzuur tot dusver nog slechts in zeldzame gevallen in zuiveren toestand is afgescheiden. Intusschen ligt het voor de hand te trachten voor de bepaling van het galacturonzuur dezelfde methoden uit te werken, welke voor de bepaling van glucuronzuur toepassing vinden. De hiervoor bekende methoden berusten op het principe, dat glucuronzuur, door koken met 12%-ig zoutzuur, primair ontleed wordt in koolzuur en xylose. Daarbij is gebleken, dat bij glucuronzuur de koolzuurafsplitsing practisch quantitatief verloopt, zoodat hierop een bepalingsmethode is te baseeren. Wat de gelijktijdig afgesplitste xylose betreft, deze wordt dan onder invloed van het zuur in furfurol omgezet. Alhoewel deze laatste omzetting geenszins quantitatief verloopt, danken wij aan TOLLENS en zijne medewerkers empirische tabellen, met behulp waarvan uit de hoeveelheid furfurolphloroglucide de hoeveelheid pentose en daarmee indirect van het glucuronzuur kan worden berekend.

Door EHRlich en SCHUBERT ¹⁾ is nu een eerste poging gedaan om deze voor glucuronzuur uitgewerkte methoden ook op galacturonzuur toe te passen. Hoewel dit laatste zuur ongetwijfeld door koken met zoutzuur in hoofdzaak op overeenkomstige wijze, d. w. z. in arabinose en koolzuur, wordt ontleed, ontbreekt het bewijs, dat ook hier de koolzuurafsplitsing quantitatief verloopt. Wat de furfurolvorming betreft, vinden genoemde onderzoekers, dat één deel furfurolphloroglucide overeenkomt met 2,94 deelen galacturonzuur. Gezien de bij de quantitative bepaling der pentosen volgens de furfurolmethode opgedane ervaring, zal het duidelijk zijn, dat deze factor strikt genomen alleen mag worden toegepast bij de hoeveelheid galacturonzuur welke EHRlich en SCHUBERT bij hunne

¹⁾ F. EHRlich und F. SCHUBERT. Bioch. Zft. 169, pag. 13, (1926).

analyse gebruikten, doch welke door deze onderzoekers niet wordt aangegeven.

Hoezeer wij dus ook moeten besluiten, dat kwantitatieve bepalingmethoden voor het galacturonzuur nog volledig ontbreken, toch scheen het aangewezen, de beide genoemde methoden voor glucuronzuurbepaling ook op galacturonzuur toe te passen, waarbij mocht worden verwacht, dat althans benaderende uitkomsten zouden worden verkregen.

Hiernaast scheen het van belang na te gaan, in hoeverre wellicht het galacturonzuur, evenals dit voor de galactose geldt, met bevredigende opbrengst tot slijmzuur zou kunnen worden geoxydeerd en op de gewichtsanalytische bepaling van dit zuur dus een kwantitatieve bepaling van het galacturonzuur zou kunnen worden gebaseerd.

Achtereenvolgens zullen nu van de drie genoemde methoden de uitvoeringswijzen worden beschreven en de uitkomsten van de toetsing dezer methoden op galacturonzuur worden weergegeven.

a. *De furfurolphloroglucidemethode van TOLLENS.*

Hieronder volgt een beschrijving der methodiek, zooals deze door mij in aansluiting op het voorschrift van TOLLENS¹⁾ steeds is toegepast:

Gebruikt werd een kolf van ongeveer 300 cc. inhoud, met een wijden hals. In de caoutchoucstop, welke de kolf afsloot, was een druppeltrechter aangebracht, waardoor zoutzuur in de kolf kon worden toegelaten. Verder bevond zich tusschen de kolf en den koeler een spatbol, om het overspatten van het zoutzuur te voorkomen. De in den koeler gecondenseerde dampen werden opgevangen in een maatglas. De kolf werd verhit met behulp van een metaalbad. Er werd nu 300 mgr. van de te onderzoeken stof in de kolf gebracht, 100 cc. zoutzuur (s. g. = 1,06; 12 % HCl) toegevoegd, het metaalbad op een zoodanige temperatuur gebracht, dat de vloeistof in de kolf goed begon te koken en 30 cc. van de furfurolhoudende vloeistof overgedestilleerd. Deze 30 cc. werd in een bekersglas van 500 cc. gebracht, waarna in de kookkolf, met behulp van den druppeltrechter, weer 30 cc. van hetzelfde zoutzuur (s. g. = 1,06) werd

¹⁾ ABDERHALDEN, Handbuch der Biol. Arb. methoden, Abt. I, Dl. 5. Kohlenhydraten, pag. 195—206.

gebracht. Er werd dan weer 30 cc. afgedestilleerd, weer 30 cc. HCl toegevoegd, enz., tot er geen furfurol meer overdestilleerde, en de stof dus geheel was ontleed. Meestal waren 9 à 12, ieder 10 à 11 minuten durende, destillatie's noodig. Om te zien, of er in het destillaat nog furfurol aanwezig was, werd gebruik gemaakt van eene oplossing van aniline-acetaat. Deze oplossing was bereid door een gelijk volume aniline en water bij elkaar te doen en hieraan druppelsgewijze azijnzuur toe te voegen, tot de vloeistof helder was geworden. Een druppel van deze vloeistof werd op een reepje filtreerpapier gebracht en hiernaast een druppel van de destilleervloeistof op zoodanige wijze, dat de druppels in elkaar vloeiden. Als er geen roode kleur meer ontstond, werd de destillatie beëindigd. Aan de destillaten, welke in het bekersglas waren verzameld, werd zooveel in zoutzuur (s. g. = 1,06) opgelost zuiver phloroglucine toegevoegd, dat er een geringe overmaat aanwezig was, om het furfurol als phloroglucide neer te slaan, waarna met zoutzuur van dezelfde sterkte tot 400 cc. werd aangevuld. De vloeistof kleurde zich eerst geel, dan groen en werd troebel. Den volgenden morgen was het furfurolphloroglucide groenzwart neergeslagen. Met aniline-acetaatpapier werd gecontroleerd, of de bovenstaande vloeistof geen furfurol meer bevatte. Het neerslag werd door een Gooch-schen kroes afgefiltreerd, welke kroes eerst met zoutzuur was uitgewasschen, dan gedroogd, gegloeid, in een exsiccator afgekoeld en gewogen. Het neerslag werd in den kroes met 150 cc. water nagewasschen en de kroes daarna gedurende 4 uren in een droogstoof bij 97° C. in een schuinen stand gedroogd, zoodat de bodem ook vrij kon drogen. Nadat de kroes weer in een exsiccator was afgekoeld, werd ze gewogen.

Ter toetsing verrichtte ik in de eerste plaats een pentosebepaling in zuivere arabinose. 300 mgr. arabinose leverde hierbij 266,9 mgr. furfurolphloroglucide, hetgeen volgens de tabel van KRÖBER overeenstemt met 297,8 mgr. arabinose.

Hierna ging ik over tot een toetsing van deze methode op galacturonzuur. Als analysemateriaal gebruikte ik hierbij een uit citroenpectine bereid bariumzout van galacturonzuur. Voor de bereiding van dit praeparaat zie men Hoofdstuk V. Hier zij slechts opgemerkt, dat voor het bariumgehalte van dit praeparaat, berekend op de droge stof, in een overeenstemmende dublobepaling 26,2% werd gevonden, hetgeen de theoretische waarde is. Bij de furfurol-

bepaling werd telkenmale uitgegaan van 300 mgr. van het praeparaat, dat blijkens een gelijktijdige vochtbepaling nog 8,65% water (gemiddelde van twee goed overeenstemmende bepalingen) bleek te bevatten. Bij deze bepalingen werden respectievelijk 68,7 en 68,1 mgr. furfurolphloroglucide verkregen. Omgerekend op het droge, vrije galacturonzuur beteekent dit, dat 203 mgr. droog vrij galacturonzuur genoemde hoeveelheden phloroglucide oplevert. Met andere woorden blijkt volgens deze analyse 1 deel furfurolphloroglucide overeen te komen met 2,95 en 2,98, gemiddeld 2,97 deelen vrij galacturonzuur.

Deze waarde is nu in zeer bevredigende overeenstemming met die van EHRlich en SCHUBERT, die voor den bewusten factor 2,94 hebben gevonden.

Hoewel de gevonden waarde verre afwijkt van de theoretische, welke men zou moeten krijgen, wanneer men aanneemt dat bij de gevolgde destillatie het galacturonzuur geheel werd ontleed volgens de vergelijking:



mag zij toch alleszins bevredigend worden genoemd, beschouwd uit het oogpunt eener empirische bepalingswijze. Immers LEFÈVRE en TOLLENS¹⁾ baseeren hunne bepalingsmethode voor het glucuronzuur op den nagenoeg gelijken empirischen factor 3,0. Dit feit gecombineerd met de zeer goede overeenstemming van mijne uitkomsten met die van EHRlich en SCHUBERT rechtvaardigt mijns inziens de conclusie, dat op deze furfurolbepaling een empirische bepalingswijze van het galacturonzuur mag worden gebaseerd. Ik heb dan ook bij het onderzoek der door mij bereide pectinestoffen steeds van bovengenoemde verhouding gebruik gemaakt.

b. *De koolzuurmethode volgens LEFÈVRE en TOLLENS.*

LEFÈVRE en TOLLENS¹⁾ hebben aan de zoeven beschreven furfurolbepaling verbonden een bepaling van het koolzuur, dat onder de genoemde voorwaarden uit glucuronzuur, overeenkomstig de hierboven voor galacturonzuur gegeven vergelijking, wordt afgesplitst. Zij zijn hierbij tot het resultaat gekomen, dat deze afsplitsing bij glucuronzuur quantitatief verloopt. Aangezien deze methode

¹⁾ K. LEFÈVRE und B. TOLLENS. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 40, pag. 4513, (1907). Abderhalden, pag. 219—220.

nog nimmer op zuiver galacturonzuur was toegepast¹⁾, besloot ik dit te doen. Dit was vooral daarom zoo belangrijk, omdat bij het onderzoek op de pectine-bouwsteen reukening moest worden gehouden met het mogelijke voorkomen van pentosen naast het galacturonzuur. Aangezien nu, voor de quantitative bepaling der pentose eveneens de furfuolmethode aangewezen was, scheen het dus zeer gewenscht voor de galacturonzuurbepaling een onafhankelijke methode te gebruiken, zoodat de daarmee corresponderende hoeveelheid phloroglucide van de totaal gevonden hoeveelheid kon worden afgetrokken, teneinde de uit de pentose afkomstige hoeveelheid te kunnen berekenen.

Alvorens de door mij voor het galacturonzuur verkregen uitkomsten weer te geven, wil ik eerst even stilstaan bij enkele moeilijkheden, welke zich bij de uitvoering voordoen en welke voor mij aanleiding werden, hierin eenige wijziging aan te brengen.

TOLLENS en LEFÈVRE²⁾ leidden voor de bepaling van het glucuronzuur koolzuurvrije lucht door een kolf, waarin zich dit zuur met eene bepaalde hoeveelheid 12%-ig zoutzuur bevond. Op de kolf was een koeler aangebracht, die de zoutzuurgassen en voor een groot gedeelte het furfuol terughield, terwijl in buisjes met kaliloog het koolzuur werd opgevangen en gewogen. NANJI, PATON en LING³⁾, die de methode rechtstreeks op bepaalde pectinestoffen toepasten, gebruikten als absorptiemateriaal voor het koolzuur eene gestelde barytoplossing, waarvan ze de overmaat terugtitreerden. Volgens hen heeft de methode van TOLLENS en LEFÈVRE het bezwaar, dat er ook kleine hoeveelheden furfuol door de loog worden geabsorbeerd. Ik kon dit bevestigen, maar deed de ervaring op, dat ook bij de methode van NANJI, PATON en LING door het barytwater wat furfuol wordt geabsorbeerd, waardoor dat eene gele kleur aanneemt. De genoemde onderzoekers titreeren de heldere vloeistof met zoutzuur en methyloorange als indicator, welke indicator mij in verband met het genoemde bezwaar niet bruikbaar bleek. Ook voor phenolphtaleïne is de gele kleur van het baryt minder aangenaam voor het waarnemen van den kleursomslag. Beter leek het

¹⁾ EHRlich en SCHUBERT geven aan, de methode op digalacturonzuur toegepast te hebben, doch geven hiervoor geen cijfers.

²⁾ K. LEFÈVRE und B. TOLLENS, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 40, pag. 4513, (1907).

³⁾ D. NANJI, F. PATON and A. LING, Journ. of the Soc. of Chem. Ind. 44, pag. 253T., (1925).

mij, om, zooals HEUSER en STÖCKIGT ¹⁾ dit doen bij hun koolzuurbepaling in oxycellulosen, een waschflesch met phloroglucine en zoutzuur in te schakelen na de kolf, waarin de stof met zoutzuur wordt gekookt. Neemt men hierna dan nog een waschflesch met zilvernitraat en salpeterzuur, dan is het gas in ieder geval vrij van furfurol en van zoutzuur. De teekening van het door mij gebruikte toestel geeft fig. 1.

De lucht wordt bij de waschflesch *a* in het toestel gezogen, passeert *a*, die gevuld is met 50%-ige kaliloog, twee torens *b* en *b'*, die met natronkalk zijn gevuld, en *a'*, die eveneens van sterke loog is voorzien. De zoo van koolzuur bevrijde lucht passeert de waschflesch *c*, die met water is gevuld en komt daarna in de kolf *d*, waarin zich de te onderzoeken stof bevindt met 100 cc. zoutzuur (12%). Na eene flinke koeling bereikt het gas, na van furfurol te zijn bevrijd in een waschflesch *e*, die 25 cc. met phloroglucine verzadigd zoutzuur bevat en van zoutzuur in een waschflesch *f*, die 25 cc. zilvernitraatoplossing bevat (1% HNO₃, 2% AgNO₃), de barytwaschflesschen *g* en *g'*. Het blijkt uit de proeven, dat het koolzuur nooit geheel door het eerste waschfleschje wordt geabsorbeerd, ook al bevat deze een groote overmaat baryt, ofschoon het aanrakingsoppervlak van het gas met het baryt nog vergroot was, door in de waschflesschen glaskralen aan te brengen. In sommige gevallen bleek het zelfs nog noodzakelijk, hierachter nog een U-buis met baryt in te schakelen. Hierna volgt dan nog een U-buis met natronkalk, waarna de lucht het toestel verlaat.

Voordat de proef begint, moet het toestel koolzuurvrij worden gemaakt. Men brengt hiertoe de te onderzoeken stof (overeenkomende met ongeveer 150 tot 250 mgr. galacturonzuur), en het zoutzuur reeds in de kolf *d*. De barytwaschflesschen *g*, *g'* en *h* zijn echter nog leeg. Men zet de zuigpomp aan, opent dan van rechts af te beginnen alle kranen en zorgt, dat er in *c* ongeveer 2 à 3 luchtbelllen per seconde door de vloeistof gaan. Zonder te verwarmen, leidt men zoo ongeveer $\frac{1}{2}$ uur à 3 kwartier lucht door het toestel. Daarna sluit men van rechts af de kranen tot en met de kraan in de buis voor de kolf *d*. *g*, *g'* en *h* worden dan van baryt voorzien, onder het nemen van de noodige voorzorgen tegen

¹⁾ E. HEUSER und F. STÖCKIGT, Cellulosechemie 53, pag. 61, (1922).

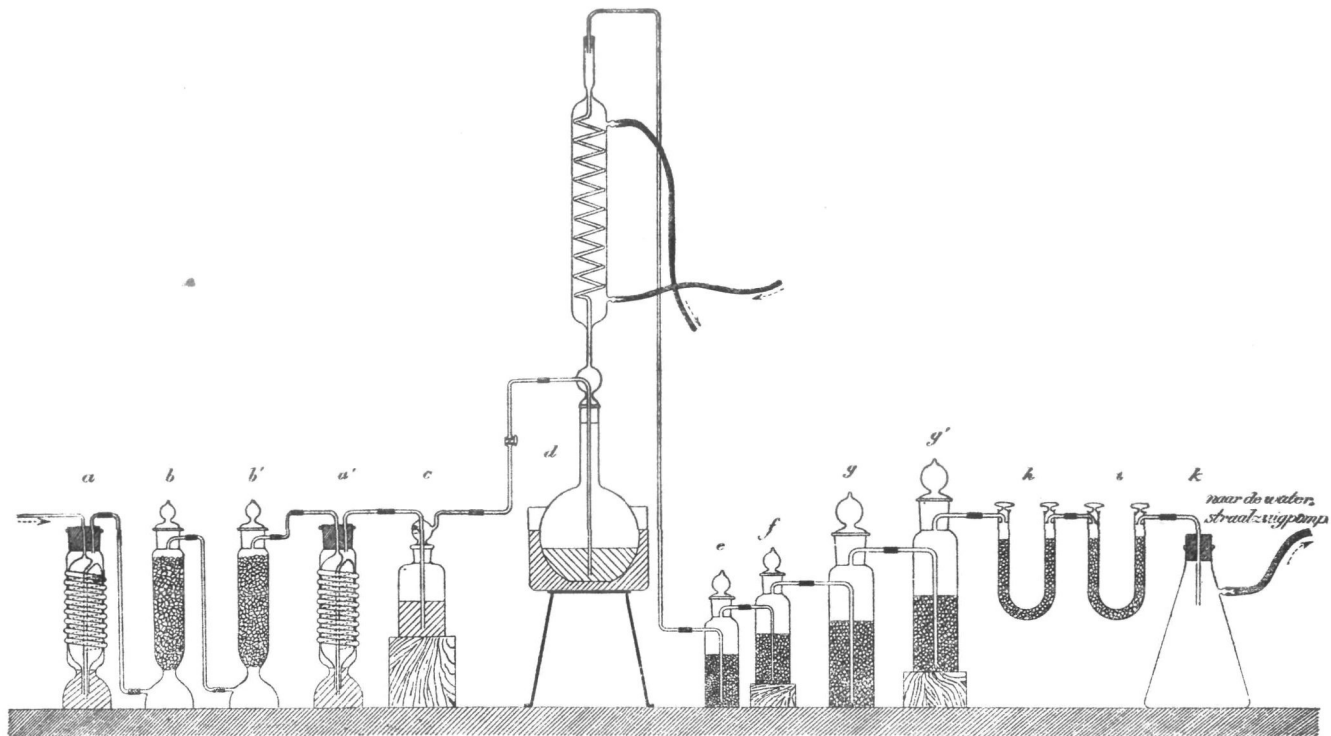


Fig. 1. Toestel voor de bepaling van uit „uronzuren” af te splitsen koolzuur.

het binnentreden van koolzuurhoudende lucht. Ze worden met dichte stoppen weer in het toestel geschakeld, waarna men van rechts af alle kranen weer opent. Daarna begint men de kolf *d* te verhitten door middel van een olie- of metaalbad. In de vloeistof in *d* worden een paar kooksteentjes gebracht, om kookvertraging te voorkomen. Vanaf het oogenblik, dat de vloeistof begint te koken, laat men de proef ongeveer $3\frac{1}{2}$ à 4 uur onder flink koken doorgaan. Bij sommige pectinestoffen bleek het zelfs noodig, om met de verhitting nog langer door te gaan.

Wordt het toestel nu weer afgezet, dan sluit men de kranen weer van rechts af. Het slangetje tusschen *b'* en *a'* wordt los gemaakt en zoo vervolgens alle slangen naar rechts, om terugslaan van de vloeistof te voorkomen. Vooral bij de kolf *d* moet men voorzichtig zijn, daar hier nog door den dampdruk de vloeistof in de toevoerbuis in de kolf kan opstijgen. Men maakt dus de verbinding tusschen *c* en *d* los en direct daarna tusschen *e* en de afvoerbuis. Het spreekt vanzelf, dat men bij deze proeven zeer goed sluitende kranen en stoppen moet hebben, terwijl men bij de verbindingen met caoutchoucslangen steeds zorgt, dat alles glas op glas sluit. De verbindings-slangen werden steeds 's nachts in water met glycerine bewaard. Wordt nauwkeurig op al deze bijzonderheden gelet, dan verloopt de proef meestal zonder moeilijkheden. Een blancoproef leverde zeer goede uitkomsten.

- | | | | |
|-----|-----------------------------|----------|-------------------|
| I. | In <i>g</i> gebracht | 42,1 cc. | 0,1 N barytwater. |
| | „ „ teruggetitreerd | 42,2 cc. | 0,1 N zoutzuur. |
| | „ <i>g'</i> gebracht | 26,3 cc. | 0,1 N barytwater. |
| | „ „ teruggetitreerd | 26,3 cc. | 0,1 N zoutzuur. |
| II. | In <i>g</i> gebracht | 42,1 cc. | 0,1 N barytwater. |
| | „ <i>g</i> teruggetitreerd | 42,2 cc. | 0,1 N zoutzuur. |
| | „ <i>g'</i> gebracht | 26,3 cc. | 0,1 N barytwater. |
| | „ <i>g'</i> teruggetitreerd | 26,3 cc. | 0,1 N zoutzuur. |

Er werd teruggetitreerd in de waschflesschen zelf, met phenolphthaleïne als indicator. Vóór de titratie werd 5 cc. 20%-ige bariumchloride-oplossing per 25 cc. toegevoegd (Bariumcarbonaat wordt onder die voorwaarde niet mede getitreerd. Zie TREADWELL¹⁾).

Alvorens nu de methode op galacturonzuur toe te passen, toetste ik haar nog aan euxanthinezuur, waarmede TOLLENS ook goede

¹⁾ F. P. TREADWELL, Anal. Chem. Bd. II, pag. 509, (1921).

uitkomsten heeft verkregen. Met een *euxanthinezuur-praeparaat* (smeltpunt 158° , opgegeven 156° — 158°), bereid door Mejjuffrouw Ir. H. ROSENSTEIN, werden de theoretische waarden 10,4% voor het ontwikkelde koolzuur gevonden. Hierbij bleek lang verhit te moeten worden. Het duurde namelijk geruimen tijd, voordat het baryt troebel begon te worden.

Bij eenige bepalingen bleek mij, dat eerst na 6 uren koken zich 10,4% CO_2 had ontwikkeld.

Opmerking verdient, dat TOLLENS opgeeft reeds na 4 uur eene quantitative splitsing van euxanthinezuur te hebben bewerkt.

Bij de toepassing van de bepaling bij galacturonzuur, werd uitgegaan van het reeds onder *a* genoemde praeparaat van het bariumzout van dit zuur. Achtereenvolgens werden een viertal malen 300 mgr. van het praeparaat afgewogen en in het boven beschreven toestel met zoutzuur verhit. Hierbij werden respectievelijk de in Tabel II opgegeven hoeveelheden koolzuur gevonden, welke tevens zijn uitgedrukt in procenten van de theoretische waarde, na omrekening op droog vrij galacturonzuur.

TABEL II.

Bepalingen van het uit bariumgalacturonaat af te splitsen koolzuur.

Nummer der proefneming	Percentage CO_2 berekend op droge Ba-vrije stof	Percentage der theoretisch te ver- wachtenhoeveelheid
I	20,1	88,4
II	19,8	87,1
III	20,3	89,3
IV	20,1	88,4
Gemiddeld:	20,1	88,3

Wij zien hieruit, dat galacturonzuur, in tegenstelling met glucuronzuur, niet quantitatief volgens het aangenomen reactieverloop wordt omgezet. Aan den anderen kant zijn de uitkomsten zoo opmerkelijk constant, dat het geoorloofd schijnt tot nader order op

de koolzuurbepaling, onder gebruikmaking van een empirischen factor — evenals dit bijvoorbeeld geschiedt bij de galactosebepaling volgens de slijmzuurmethode — een quantitative bepaling van het galacturonzuur te baseeren.

c. *De slijmzuurmethode volgens TOLLENS — VAN DER HAAR.*

In zijn „Anleitung zum Nachweis, zur Trennung und Bestimmung der Monosaccharide und Aldehydsäuren” geeft A. W. VAN DER HAAR voor de bepaling van galacturonzuur op verschillende plaatsen aan, dat het mogelijk moet zijn galacturonzuur als slijmzuur te bepalen, door toepassing van dezelfde bewerking, die daarvoor voor galactose gebruikelijk is, n.l. door oxydatie met salpeterzuur, onder streng omschreven voorwaarden. Intusschen is deze kwestie blijkbaar door hem niet experimenteel nagegaan.

Ik ging bij mijn proefnemingen geheel overeenkomstig het voorschrift van VAN DER HAAR te werk (zie § 4) en volsta hier met de mededeeling, dat mij spoedig bleek, dat er van een quantitative oxydatie van galacturonzuur tot slijmzuur geen sprake was. Bovendien waren de opbrengsten zeer wisselend. Waarschijnlijk wordt het galacturonzuur onder de genoemde voorwaarden ook ten deele in een pentose en koolzuur gesplitst. Dit neemt niet weg, dat er wel wat slijmzuur wordt gevormd, hetgeen van belang is in die gevallen, waarin galactose naast galacturonzuur onder de splitsingsproducten van de pectinestoffen voorkomt. Dit beteekent toch, dat voor een bepaling van galactose naast galacturonzuur de slijmzuurmethode niet bruikbaar is.

Hieraan kan nog worden toegevoegd, dat EHRLICH en VON SOMMERFELD¹⁾ getracht hebben de bewuste oxydatie met broom in plaats van met salpeterzuur tot stand te doen komen, waarbij zij evenwel de ervaring opdeden, dat ook hier de oxydatie geenszins quantitatief verloopt.

§ 3. *De bepaling van methylalcohol.*

Voor de methylalcoholbepaling bestaan verschillende methode's. Ik heb alleen gebruik gemaakt van de methode, welke door VON FELLEBERG²⁾ bij zijn onderzoek der pectinestoffen is aangegeven

¹⁾ F. EHRLICH und R. VON SOMMERFELD, Bioch. Zft. 168, pag. 263, (1926).

²⁾ TH. VON FELLEBERG, Bioch. Zft. 85, pag. 69, (1917).

en waarvan het principe afkomstig is van DENIGÈS. In Hoofdstuk I is reeds gesproken over de reactie's, waarop deze methode berust en welke verbeteringen door VON FELLEBERG hierin zijn aangebracht.

Voor de bepaling worden de volgende oplossingen vereischt:

1e. *Alcohol-zwavelzuur*, bereid door oplossing van 21 cc. 95% -igen zuiveren alcohol in water, toevoeging van 40 cc. geconcentreerd zwavelzuur en verdunning met water tot 200 cc.

2e. *Kaliumpermanganaatoplossing*, 5 gr. in 100 cc. water.

3e. *Oxaalzuuroplossing*, 8 gr. in 100 cc. water.

4e. *Zuiver geconcentreerd zwavelzuur*.

5e. *Fuchsine-zwaveligzuur*, bereid door oplossen van 5 gr. fuchsine, 12 gr. natriumsulfiet en 100 cc. 1 N zwavelzuur en aanvullen met water tot 1 L. De oplossing moet in het donker worden bewaard, het gemakkelijkst door zwart papier om de flesch te plakken. De ervaring heeft mij geleerd, dat men het beste eerst de zuivere fuchsine in een mortier goed fijn wrijft, waarna ze in warm water, waaraan het zuur reeds is toegevoegd, wordt opgelost. Men laat de stof eerst goed oplossen, waarna in de zwarte flesch er 12 gr. natriumsulfiet aan wordt toegevoegd. De fuchsine-oplossing is dan na een nacht heelemaal opgebleekt tot een lichtgele kleur.

6e. Een methylnalcoholoplossing van 1 gr. op 100 cc., verkregen door oplossen van 12,67 cc. (= 10 gr.) zuiveren methylnalcohol tot 1 L., en eene dergelijke oplossing van 0,1 gr. in 100 cc., die verkregen wordt door 100 cc. van de bovengenoemde 1%-ige oplossing tot 1 L. te verdunnen.

Heeft men nu een methylnalcoholhoudend destillaat, dan wordt hiervan 3 cc. in een colorimeterglas (cilinderglas met platten bodem) van ongeveer 40 à 50 cc. gebracht. Hieraan wordt 1 cc. van de alcoholzwavelzuuroplossing toegevoegd en verder 1 cc. van de permanganaatoplossing, even omgeschud en vervolgens laat men het precies 2 minuten staan. Op dezelfde manier worden 3 typen van de methylnalcoholstandaardoplossing behandeld, waarvan het eerste 0,5 cc. 1% methylnalcoholoplossing (= 5 mgr.) en 2,5 cc. water, het tweede 1 cc. 1^o/₁₀₀ oplossing (= 1 mgr.) en 2 cc. water en het derde 0,3 cc. 1^o/₁₀₀ oplossing (= 0,3 mgr.) en 2,7 cc. water bevat. Na 2 minuten voegt men overal 1 cc. van de oxaalzuuroplossing aan toe en zorgt, dat hierbij eventueel aan den wand hangende druppels permanganaatoplossing mee in de vloeistof komen. Men voegt dan 1 cc. geconcentreerd zwavelzuur toe en

direct daarna 5 cc. fuchsine-zwaveligzuur en mengt de vloeistof goed, terwijl weer de wanden van het glas goed worden afgespoeld met de vloeistof. Men laat de vloeistof nu een uur staan, en ziet dan, welk type van de standaardoplossingen de onderzochte oplossing het meeste in kleursterkte benadert.

Eene nauwkeurige colorimetrische vergelijking geschiedt dan met dit type vergelykingsoplossing. Is het het type van 5 mgr., dan verdunt men met 100 cc. water; is het een der beide andere, dan verdunt men met 25 cc. water en vergelykt de kleurintensiteit in een gevoeligen colorimeter, bijvoorbeeld die van DUBOSQ. Voor eene nauwkeurige bepaling moet steeds getracht worden eene concentratie van de standaardoplossing te maken, die zoo weinig mogelijk verschilt met de gevraagde oplossing. Wat de betrouwbaarheid dezer methode betreft, zij hier verwezen naar Hoofdstuk VII, waar, bij de inwerking van pectase op pectinepraeparaten, verschillende contrôlebepalingen zijn verricht.

§ 4. De bepaling van galactose.

Zooals reeds in § 2 werd vermeld, kan galactose door oxydatie met salpeterzuur in slijmzuur worden omgezet. Hoewel ook hier de oxydatie niet quantitatief verloopt, zijn door VAN DER HAAR empirische tabellen gegeven, met behulp waarvan men uit de hoeveelheid verkregen slijmzuur tot de hoeveelheid aanwezige galactose kan concludeeren. Een eerste voorwaarde voor het gebruik van deze tabellen is intusschen dat men stipt werkt volgens het door VAN DER HAAR gegeven voorschrift, en dus onder meer bij de oxydatie precies van 1 gr. stof uitgaat. Bij de toepassing der methode op de hydrolyseproducten eener pectinestof werd dus steeds de eventueel ontbrekende hoeveelheid met rietsuiker tot 1 gr. aangevuld. Ik geef hier het voorschrift van VAN DER HAAR nog even weer:

500 mgr. zuivere galactose en 500 mgr. omgekristalliseerde saccharose worden in water opgelost tot een totaal volume van 30 cc. Hieraan wordt 30 cc. 50%-ig salpeterzuur toegevoegd. De vloeistof wordt nu in een iets scheefstaand bekeerglas, dat 12 c.m. hoog is en waarvan de diameter van den bodem 60 m.m. bedraagt, in een kokend waterbad ingedampt onder voortdurend omroeren, tot de inhoud van het bekeerglas tot een gewicht van iets beneden

20 gr. is gedaald. Het waterbad moet van het begin af koken. De bekersglazen moeten zoo hoog zijn, om spatten te voorkomen. De oxydatie moet steeds in denzelfden tijd verlopen. De vloeistof wordt nu afgekoeld en bijgevuld met water tot precies 20 gr. Hieraan wordt 500 mgr. zuiver droog slijmzuur toegevoegd en daarna het bekersglas met een horlogeglas bedekt, waarna men het 48 uur bij ongeveer 15° C. laat staan, gedurende welken tijd vele malen wordt geschud en de slijmzuurkristallen zich afzetten. Er wordt nu een Gooch-sche kroes met asbest eerst met salpeterzuur, daarna met water uitgewasschen, dan gedroogd en gegloeid en na afkoeling in een exsiccator gewogen. Hierdoor wordt daarna de bovengenoemde vloeistof gefiltreerd en daarna het slijmzuur-neerslag met 4×5 cc. bij 15°C. verzadigde waterige slijmzuuroplossing in den Gooch-schen kroes verzameld en gewasschen. Ten slotte wordt met 5 cc. water gewasschen en de kroes met inhoud in een waterdroogstoof tot constant gewicht gedroogd en weer, na afkoeling in een exsiccator, gewogen. Na aftrek van het gewicht van den kroes met asbest en 500 mgr. slijmzuur vindt men het gewicht van het gevormde slijmzuur, en kan dan verder in de door VAN DER HAAR opgestelde tabel de daarmede overeenstemmende hoeveelheid galactose vinden.

Bij een contrôle-bepaling met zuivere galactose werd de in de tabel opgegeven waarde voor slijmzuur inderdaad gevonden.

§ 5. De bepaling van arabinose.

Voor de quantitative bepaling van arabinose komt uitsluitend de furfuroolphloroglucidemethode van TOLLENS in aanmerking. Deze is reeds in § 2 onder *a* uitvoerig behandeld.

§ 6. De bepaling van azijnzuur en aceton.

De bepaling van azijnzuur onder de hydrolyseproducten van de pectinestoffen geschiedde in navolging van EHRLICH en VON SOMMERFELD (l. c.) door stoomdestillatie en titratie van het destillaat met 0,1 N. NaOH-oplossing. Een nadere beschrijving van deze methode kan achterwege blijven, daar azijnzuur in de door mij onderzochte pectinestoffen afwezig bleek te zijn. Hetzelfde geldt voor de acetonbepaling, daar ook aceton nimmer kwalitatief kon worden aangetoond.

§ 7. **Samenvatting en bepaling der onveranderde pectine-
stoffen.**

Wij moeten uit de voorafgaande paragrafen besluiten, dat voorloopig voor de quantitative bepaling van verschillende hydrolyseproducten der pectinestoffen ons slechts zeer benaderende methoden ten dienste staan. In het bijzonder geldt dit voor de ongetwijfeld belangrijkste bouwstenen: het galacturonzuur en de pentose, voor welke bepaling men op omzettingen is aangewezen, die niet quantitatief verlopen en welke slechts door invoering van empirische factoren tot bruikbare resultaten aanleiding geven. Daarbij wordt de situatie nog verergerd door het feit, dat de bepaling van pentosen naast galacturonzuur noodzakelijkerwijze een verschilbepaling moet zijn.

Terwijl deze toestand reeds bezwarend zou zijn, indien men de beschikking had over een quantitatief volledig mengsel van de hydrolyseproducten eener pectinestof, is het ongetwijfeld nog een nadeel, dat men bij het onderzoek eener pectinestof zelve, bij de koolzuur-, resp. furfurolafplitsingsbewerking, tevens de hydrolyse moet tot stand brengen. Het staat toch te vreezen, dat de geleidelijke afsplitsing der te bepalen bouwstenen niet zonder invloed zal zijn op de empirische factoren, waarop de omrekening der uitkomsten zijn gebaseerd. Alles bijeen genomen lijdt het geen twijfel of toepassing der bepalingsmethoden op de complexe pectinestoffen zal slechts benaderende uitkomsten geven. Desniettemin lijkt het loonend een dergelijk onderzoek te verrichten en op grond van het voorafgaande zal dan daarbij den volgenden weg moeten worden ingeslagen.

In de eerste plaats zal het aangewezen zijn om uit de koolzuurbepaling (zie § 2b) te besluiten tot de hoeveelheid aanwezig galacturonzuur. Toepassing van de furfurol-phloroglucidebepaling zal dan uitsluitel kunnen geven over de hoeveelheid furfurol, welke zoowel uit het galacturonzuur als uit de eventueel aanwezige pentosen ontstaat. Daar intusschen berekend kan worden, welke hoeveelheid furfurolphloroglucide door het aanwezige galacturonzuur wordt geleverd, zal men door aftrekking het uit de pentosen afkomstige furfurolphloroglucide kunnen vinden en daaruit tot de hoeveelheid dier pentosen kunnen besluiten. In de hoeveelheid slijmzuur, die bij oxydatie met salpeterzuur wordt verkregen, zal men een

waarde kunnen vinden voor de maximaal aanwezige hoeveelheid galactose. Een juiste bepaling van deze suiker zal evenwel niet mogelijk zijn, daar ook galacturonzuur ten deele maar met wisselende opbrengst bij deze oxydatie slijmzuur oplevert. Eindelijk zullen eventueel aanwezige methylalcohol, azijnzuur en aceton met bevredigende nauwkeurigheid kunnen worden bepaald.

Tenslotte moge hier nog een enkele opmerking worden gemaakt over de quantitative bepaling van onveranderde pectinestoffen, welke intusschen nog nauwelijks uitvoerbaar moet worden geacht en door mij dan ook maar zelden is toegepast. Volledigheids-halve maak ik er evenwel hier even melding van:

In de eerste plaats maakt men hier wel eens gebruik van de alcoholpraecipitatiemethode, welke intusschen zeer ruw is, daar met alcohol tevens verschillende andere stoffen, zooals eiwitten enz. worden neergeslagen. Het pectinestofhoudend materiaal wordt, indien noodig, eerst met zuur behandeld, daarna met water ge-extraheerd, en pectine uit de extractievloeistof met alcohol of aangezuurden alcohol neergeslagen.

Dit geldt dan nog alleen voor protopectine en pectine. Het pectinezuur zal met loog kunnen worden opgelost en kan dan door eene praecipitatie met aangezuurden alcohol, met eene zeer grove benadering, worden bepaald.

Voor een meer nauwkeurige bepaling van de pectinestoffen in hun geheel wordt ook wel gebruik gemaakt van de calciumpectaatmethode van CARRÉ en HAYNES¹⁾, die berust op het in oplossing brengen van alle pectinestoffen met behulp van verdunde natronloog, waarna ze met calciumchloride als calciumpectaat worden neergeslagen.

Eene modificatie van deze methode gaven EMMETT en CARRÉ²⁾ voor de bepaling van pectine in appelsap, in het algemeen in vloeistoffen, die nog andere stoffen bevatten, die met CaCl_2 kunnen neerslaan, zooals bijvoorbeeld oxalaten. Een nieuwe methode voor de bepaling van tevoren geïsoleerde pectinestoffen geven verder nog AHMANN en HOOKER³⁾. Deze methode berust op de omzetting van de pectine in een verdunde waterige oplossing met behulp van een groote

¹⁾ M. CARRÉ and D. HAYNES, *Bioch. Journ.* 16, pag. 60, (1922).

²⁾ A. EMMETT and M. CARRÉ, *Bioch. Journ.* 20, pag. 6, (1926).

³⁾ C. AHMANN and H. D. HOOKER, *Journ. of Ind. and Eng. Chem.* 18, pag. 412, (1926).

overmaat 0,1 N. natronloog, waarna de overmaat loog teruggetitreerd wordt met zoutzuur van een bekende sterkte. De hoeveelheid loog, die nodig is geweest voor de omzetting van pectine in pectinezuur en voor de neutralisering van de totale hoeveelheid pectinezuur is een maat voor de aanwezigheid van de totale hoeveelheid pectine-stoffen.

HOOFDSTUK V.

BEREIDING EN ANALYSE VAN DE VERSCHILLENDE PECTINESTOFFEN UIT CITROENSCHILLEN.

§ 1. De protopectine.

In de eerste plaats stelde ik mij ten doel om protopectine volgens het door SUCHARIPA¹⁾ gegeven voorschrift, te bereiden uit citroenschillen. Zoals reeds is meegedeeld, staat genoemde onderzoeker op het standpunt, dat de door hem geïsoleerde protopectine een mengsel is van een aantal stoffen, welke pectine en cellulose in wisselende hoeveelheden gebonden bevatten.

Alvorens tot de beschrijving van mijn eigen proefnemingen over te gaan, wil ik hier eerst het door SUCHARIPA gegeven voorschrift gedetailleerd weergeven.

Het droge wit der citroenschillen (albedo) wordt met alcohol en daarna met aether zoolang warm geëxtraheerd, tot in het extract geen aetherische oliën en andere producten meer zijn aan te toonen. Daarna worden de schillen zeer fijn gemalen en gezeefd door een zeer fijne zijden zeef, zoodat microscopisch kan worden geconstateerd, dat er geen cellen meer intact zijn. Door herhaalde extractie's met koud water wordt het poeder verder bevrijd van oplosbare pectine, waarna met SCHWEIZER's reagens de cellulose geheel wordt verwijderd, door het poeder eerst op te wrijven met het reagens in een mortier (bij een temperatuur beneden 0° C.) en dan 2 dagen met een overmaat van de koperoxydammoniakovloestof in een bad met een koudmakend mengsel te laten staan. De vloestof wordt dan afgezogen en blijkt bij aanzuren zeer veel cellulose te bevatten. Deze zelfde bewerking wordt net zoo lang herhaald tot er geen cellulose meer in het extract is aan te toonen. Het poeder wordt met water uitgewassen en daarna herhaalde malen met 2%-ig azijnzuur behandeld en een nacht met dit zuur geëxtraheerd, daarna goed met water gewassen en na een behandeling met alcohol eerst en tenslotte met aether in vacuüm gedroogd.

Bij mijn proefnemingen ging ik uit van een vijftigtal citroenen. Deze werden eerst gewassen, daarna dun geschild op zoodanige

¹⁾ R. SUCHARIPA, J. of the Am. Chem. Soc. 46, pag. 145, (1924).

wijze, dat juist de buitenste gele oliehoudende schil (flavedo) werd verwijderd, waarna de witte schil (albedo) kon worden afgetrokken en verzameld. De verse albedo werd direct in een overmaat 96%-igen alcohol gebracht en daarna gedroogd, wat het voordeel heeft, dat de oxydeerende enzymen dan direct onwerkzaam worden gemaakt, waardoor een kleuring van de albedo wordt voorkomen. De daarna gedroogde massa werd vervolgens voorloopig grof gemalen en verder geheel volgens het voorschrift van SUCHARIPA behandeld.

Teneinde een denkbeeld te krijgen van de veranderingen in samenstelling, welke het product bij de verschillende behandelingen ondergaat, verrichte ik zoowel van het uitgangsmateriaal (de albedo) als van dit materiaal na extractie met alcohol en aether, als van het product verkregen, na daaropvolgende extractie met water en tenslotte van het eindproduct eenige analytische bepalingen. Deze bepalingen betroffen het aschgehalte (berekend op droge stof), het gehalte aan furfuroleverende bouwsteen, te weten galacturonzuur en eventueel aanwezige pentose en het gehalte aan in veresterden toestand aanwezigen methylalcohol. Hierbij moge worden opgemerkt, dat de furfurolbepaling geheel geschiedde op de wijze, zooals dit in Hoofdstuk IV voor het galacturonzuur is aangegeven, wat mogelijk is, omdat mag worden vertrouwd, dat bij het koken met 12%-ig zoutzuur de aanwezige pectinestoffen primair in hare bouwsteen worden ontleed. De hieronder volgende tabel III geeft een samenvatting van de hierbij verkregen resultaten.

TABEL III.

Analyseresultaten van volgens SUCHARIPA uit het wit der citroenschillen bereide protopectine en van de daarbij verkregen tusschenproducten.

Stof:	Aschgehalte op droge stof	Phloroglucide op droge stof	Phloroglucide op droge aschvrije stof	Methylalcohol op droge stof.
I „Albedo”	3 %	21,9 %	22,6 %	2,8 %
II „ na extr.m.alcoholenaether	3,1 %	29,9 %	30,9 %	3,1 %
III Stof II na extractie met water..	2,1 %	29,4 %	30,0 %	3,3 %
IV Eindproduct	14,7 %	31,0 %	36,5 %	0 %

Wij zien uit deze tabel in de eerste plaats, dat het mij niet gelukt is om, in overeenstemming met SUCHARIPA's resultaten een methylalcoholhoudend eindproduct te verkrijgen, ondanks het feit, dat ik de door dezen onderzoeker aangegeven voorzorgen, zooals het werken bij zeer lage temperatuur, stipt heb in acht genomen. Het komt mij persoonlijk dan ook zeer onwaarschijnlijk voor, dat het mogelijk zou zijn protopectine aan een zoo langdurige behandeling met ammoniak te onderwerpen, zonder dat daarbij methylalcoholafplitsing zou plaats vinden.

Terwijl bij de praeparaten I, II en III de asch grootendeels uit CaO (naast weinig MgO) bestond, bevatte de asch van praeparaat IV niet minder dan 72% CuO, hetgeen dus aantoonde, dat de protopectine met azijnzuur niet kopervrij was te verkrijgen.

Uit de phloroglucidebepalingen blijkt, hoe het gehalte aan furfuroleverende stoffen sterk toeneemt bij de extractie met alcohol en aether. Bij de daaropvolgende extractie met water, welke onder meer beoogt de vrije pectine van de protopectine af te scheiden, daalt dit gehalte, doch slechts in geringe mate. Dit wijst er op, dat tegelijk met de verwijdering van de pectine ook een verwijdering van niet-pectinestoffen plaats heeft. De daaropvolgende extractie van de vrije cellulose doet overeenkomstig de verwachting het gehalte aan furfuroleverende stoffen merkbaar stijgen.

Wij moeten dus concluderen, dat het mij niet mogelijk bleek een scheiding van protopectine en vrije cellulose te bewerkstelligen: het verkregen eindproduct toch wijkt en door zijn hoog kopergehalte en door het ontbreken van methylalcohol aanmerkelijk van de natuurlijke protopectine af. Daarentegen zal praeparaat III bruikbaar zijn voor proefnemingen in zake de binding van de pectinestoffen in de protopectine, waarbij er dan evenwel rekening mede is te houden, dat dit praeparaat mogelijk nog vrije cellulose bevat.

§ 2. De pectine.

In de tweede plaats ben ik er toe overgegaan de in citroenschillen aanwezige pectinestoffen in oplosbaren toestand, doch overigens zoo weinig mogelijk veranderd, af te scheiden. Eenerzijds betrof dit dus de reeds in oplosbaren toestand in de citroenschillen aanwezige pectinestoffen, anderzijds hield dit dus in, dat de proto-

pectine aan een voorzichtige hydrolyse moest worden onderworpen of indien men zich op het standpunt van TUTIN stelt, de in de celwanden als zoodanig reeds aanwezige doch uiterst fijn met de overige celwandstoffen vermengde pectine in oplossing moest worden gebracht.

Ik ging hierbij op verschillende wijzen te werk:

1e methode.

Hierbij volgde ik in hoofdzaak het recept van DENTON, JOHNSTIN en WALKER YEATMAN¹⁾, waarin ik evenwel eenige wijzigingen aanbracht. Verwerkt werden 100 citroenen. Deze werden wederom gewasschen, van de gele schil ontdaan, waarna de witte schil werd verzameld. De aldus verkregen albedo werd met water gewasschen en daarna gedroogd, waarbij 320 gr. uitgangsmateriaal werd verkregen.

De schillen werden nu gemalen, daarna in een soxhlet-apparaat eerst met alcohol, daarna met aether geëxtraheerd en weder gedroogd bij 33° C. Ze werden daarop in 5 L. water gebracht, dat was aangezuurd met wijnsteenzuur, waarna men de schillen een nacht liet weeken. De zoo verkregen dikke pap werd even opgekookt en dan door een linnen doek gefiltreerd, waarna dezelfde bewerking met de schillen nog driemaal werd herhaald. De gezamenlijke filtraten werden verder tot de helft ingedampt, daarna gecentrifugeerd, waarna met 2½ maal de hoeveelheid 96 %-igen alcohol de pectine werd neergeslagen. De zoo verkregen zeer volumineuse geleachtige pectine werd in een linnen doek zoo droog mogelijk uitgeknepen en werd dan weer in kokend water opgelost, door een fijnen doek gefiltreerd en opnieuw met 2½ maal de hoeveelheid alcohol neergeslagen, welke bewerkingen daarna nog driemaal werden herhaald. Het aldus verkregen product werd met 96 %-igen alcohol, daarna met alcohol en aether en tenslotte met aether uitgewasschen, waarna het op filtreerpapier werd uitgespreid en gedroogd bij ± 33° C. De zoo verkregen pectine, die dikwijls nog hier en daar tot hoornachtige stukjes was samengeklonterd, werd nog eenige malen door een fijnen molen gemalen en gezeefd. De opbrengst was ± 63 gr.

¹⁾ M. DENTON, R. JOHNSTIN and F. WALKER YEATMAN, U. S. A. Dep. Agr. Circ. 254.

van een grauwwit poeder. Dit product zal in het vervolg als citroenpectine A worden aangeduid.

Ik verrichtte nu van deze citroenpectine A de volgende analytische bepalingen.

In de eerste plaats bepaalde ik het aschgehalte, dat berekend op droge stof $3\frac{1}{2}\%$ bleek te bedragen. Van deze asch bleek 71% uit CaO te bestaan, terwijl verder het ijzergehalte, uitgedrukt als Fe, 6,6% bedroeg.

Vervolgens werd galacturonzuur bepaald volgens de koolzuur-methode. Uitgedrukt in galacturonzuur-anhydride bedroeg dit gehalte, berekend op de droge pectine, 63,8%. Een dergelijke hoeveelheid galacturonzuur zou bij de furfurolbepaling per gram pectine 239 mgr. furfurolphloroglucide opleveren. Bij een directe bepaling werd 362 mgr. furfurolphloroglucide verkregen, hetgeen dus op de aanwezigheid van al of niet gepolymeriseerde pentosen in de pectine wijst.

Tenslotte werd nog een methylalcoholbepaling verricht, waarbij een gehalte van 9,3%, berekend op de droge pectine, werd gevonden.

2e methode.

In aansluiting aan de voorschriften van SUCHARIPA heb ik verder nog de volgende werkwijze toegepast om verschillende pectinepraeparaten in handen te krijgen.

De citroenschillen werden weer verkregen zoals bij de bereiding van pectine A en weer met alcohol en aether (nu ook warm) geëxtraheerd, tot er geen spoor van extractstoffen meer was aan te toonen in de extractievloeistof. Om nu in de eerste plaats de zogenoemde vrije pectine te verkrijgen, werden de schillen met gedestilleerd water bij 50° C. gedurende 8 uren geëxtraheerd. Dit maal bleef dus iedere toevoeging van zuur achterwege met de opzettelijke bedoeling om de protopectine zooveel mogelijk onaangetast te laten. De massa werd daarna twee malen door een fijnen katoenen doek gefiltreerd, in een porceleinen apparaat bij 35° C. in vacuum tot op één derde van het volume ingedampt en vervolgens met drie maal de hoeveelheid alcohol neergeslagen. Een grove draderige geleimassa sloeg neer, welke zich nu gemakkelijk door een fijnen katoenen doek liet filtreren. Deze pectine werd

verder op dezelfde manier als pectine A met alcohol en aether behandeld en wordt pectine I genoemd. De op deze wijze éénmaal met water geëxtraheerde albedo werd nu verder nog eens gedurende 2 uren met een nieuwe hoeveelheid water geëxtraheerd, maar nu bij kooktemperatuur.

Uit het op deze wijze verkregen extract werd nu op geheel dezelfde wijze als voor pectine I is aangegeven de pectine geïsoleerd, welke hier verder als pectine II zal worden aangeduid. Slechts zij opgemerkt, dat — en dit geldt ook voor de hieronder te noemen pectine III en IV — in verband met de grootere volumina der te verwerken vloeistof in een koperen vacuumapparaat werd ingedampt, wat helaas tengevolge had, dat geringe sporen koper in het praeparaat terecht kwamen, waardoor dit een lichtgroene kleur kreeg.

Daarna werd de albedo in een autoclaaf bij 110° gedurende 2 uren geëxtraheerd, welke extractie pectine III opleverde. Een volgende extractie bij 120° leverde pectine IV. Bij een nog hogere temperatuur werd de pectine bruin en ontleedde.

Van deze ongetwijfeld nog onzuivere pectinepraeparaten werd het aschgehalte bepaald. Daarnaast werd het gehalte aan furfurolleverende stoffen ter onderlinge vergelijking vastgesteld. In onderstaande tabel IV is dit eenvoudig als percentage furfurolphloroglucide, berekend op de droge pectine, weergegeven. Ook het aschgehalte en het CaO-gehalte is op deze wijze uitgedrukt.

TABEL IV.

Analyseresultaten van verschillende uit het wit der citroenschillen bereide pectine-soorten.

Pectine	Asch	CaO	Phloroglucide
I	7,5	3,0	31,1
II	7,1	1,8	29,5
III	5,7	1,8	36,1

§ 3. Zure pectine en de daarvan afgeleide zouten.

Het belangrijke doch wisselende aschgehalte van de in de vorige paragraaf beschreven pectinepraeparaten leek er op te wijzen, dat deze pectinen inderdaad een zwak zuur karakter hadden, waarbij dan de zuurgroepen, hetzij reeds in de plant zelve, hetzij bij de gevolgde extractie-methode, zich met verschillende metalen hadden geneutraliseerd. Het leek dus van belang te trachten, deze praeparaten van de bewuste anorganische bestanddeelen te bevrijden, aangezien verwacht mocht worden dat de aldus verkregen zure pectine (voor deze benaming vergelijk men Hoofdstuk III) een product van meer constante samenstelling zou blijken te zijn en daardoor voor een nader onderzoek meer toegankelijk.

De bereiding van zure pectine geschiedde op zeer eenvoudige wijze, door aan de oplossing van de vrijwel neutrale pectine III zooveel alcohol en zoutzuur toe te voegen, dat de oplossing 70% alcohol en 1% zoutzuur bevatte. Ik liet deze oplossing 2 uren staan en waschte de op deze wijze neergeslagen zure pectine eenige malen met een dergelijken aangezuurden alcohol uit en tenslotte met 70%-igen alcohol zonder zuur. De zure pectine werd daarna nog eens in gedestilleerd water opgelost en over „kieselguhr” gefiltreerd, welke filtratie niet erg vlug maar toch goed verliep en waarbij ik een mooi helder filtraat verkreeg. Deze oplossing werd met alcohol neergeslagen en de zure pectine verder net zoolang met alcohol geëxtraheerd, tot het filtraat met zilvernitraat absoluut geen chloorreactie meer vertoonde. De zure pectine werd dan verder met 96%-igen alcohol, met absoluten alcohol en met absoluten aether goed gewasschen en in vacuum gedroogd. De aldus verkregen zure citroenpectine was een mooi wit product. Terwijl op het onderzoek van deze zure pectine in § 6 nader zal worden teruggekomen, zal hier in de eerste plaats iets worden medegedeeld over de bereiding respectievelijk van het calcium- en van het ammoniumzout van deze stof.

Het calciumzout werd bereid door een oplossing van de zure pectine nauwkeurig met 0,1%-ig kalkwater te neutraliseeren. Het gevormde zout werd met 80%-igen alcohol neergeslagen, daarna met 80%-igen en vervolgens met 96%-igen alcohol en ten slotte met aether uitgewasschen, waarna het praeparaat in vacuum werd gedroogd.

Het ammoniumzout van de zure pectine werd op overeenkomstige wijze bereid als het calciumzout door n.l. 1%-ige ammoniakoplossing bij de zure pectine te druppelen. Het verkregen neerslag werd wederom met alcohol en aether uitgewasschen en in vacuum gedroogd. Het gevormde ammoniumzout bleek evenwel niet bestendig; bij hernieuwde oplossing in water toch reageerde het steeds weer zuur.

Zoowel van de zure pectine zelve als van het daarvan bereide calciumzout werden nu verschillende analytische bepalingen verricht. Deze bepalingen omvatten: 1e. de aschbepaling, 2e. het gehalte aan Ca, 3e. de methylalcoholbepaling, 4e. de bepaling van het afgesplitste koolzuur volgens de methode van LEFÈVRE en TOLLENS en 5e. de bepaling van de opbrengst aan furfurolphloroglucide volgens TOLLENS. Terwijl op de interpretatie van de verkregen cijfers later zal worden teruggekomen, geef ik hier de gevonden cijfers alle omgerekend in percentages van de droge pectinestof in tabel V weer.

TABEL V.

Analyseresultaten van uit het wit der citroenschillen bereide zure pectine en van het calciumzout hiervan.

Stof.	Asch	CaO	Methylalcohol	Koolzuur	Furfurolphloroglucide
Zure citroenpectine	1,16	0,7	11,0	18,3	50,35
Ca-zout van zure citroenpectine..	3,92	3,9	7,1	17,6	49,0

§ 4. Pectinezuur en de daarvan afgeleide zouten.

Met de zure pectine en zijn calciumzout hebben wij kennis gemaakt met pectinestoffen, waarbij een deel der zuurgroepen met methylalcohol waren veresterd, terwijl een ander deel dier groepen hetzij in vrijen toestand, hetzij aan calcium gebonden aanwezig waren. Dit feit bracht met zich, dat men hier allicht te doen heeft met mengsels van pectinestoffen van wisselende

samenstelling, waardoor ook deze praeparaten zich minder leenen voor een nadere bepaling der constitutie. In verband hiermede lag het voor de hand, thans over te gaan tot de bereiding van het pectinezuur, dat is dus die pectinestof, waarin *alle* zuurgroepen in vrijen toestand aanwezig zijn. Zoodoende mocht men verwachten een pectinestof te verkrijgen, waarvan de samenstelling niet door een vrij willekeurig gehalte aan methylalcohol werd beïnvloed. Juist de vergelijking van de samenstelling van het pectinezuur met die van de daarvan bereide zouten, scheen geschikt om een vaststelling van het aantal zure groepen in de kern van het pectine-molecule mogelijk te maken.

De bereiding van citroenpectinezuur geschiedde als volgt:

40 gr. citroenpectine III werd opgelost in 2 L. water. Daarna werd 40 gr. „kieselguhr” (dat vooraf met gedestilleerd water was gereinigd) toegevoegd, waarna ik het mengsel nog even op het waterbad liet staan. Werde deze massa gefiltreerd, dan verkreeg ik een helder groengeel filtraat (de groene kleur hield verband met het eerder vermelde feit, dat deze pectine in koperen vacuumpannen was ingedampt). Aan deze oplossing werd nu 2 N. NaOH-oplossing voorzichtig in kleine hoeveelheden toegevoegd, totdat de oplossing niet weer na eenigen tijd zuur werd. Hiervoor bleken ± 55 cc. 2 N. NaOH noodig. De vloeistof werd nu $1\frac{1}{2}$ uur op het waterbad gezet, waarbij nog eens werd gecontroleerd of niet opnieuw een zure reactie optrad. De vloeistof had hierdoor een bruingele kleur gekregen, welke kleur zeer karakteristiek is voor een alkalische oplossing van pectinestoffen. Van deze vloeistof werd $1\frac{1}{2}$ L. langzaam in 4 L. 96%-igen alcohol gedruppeld, die $\pm 2\%$ geconcentreerd zoutzuur bevatte. De kleur werd weer wit. Het neergeslagen pectinezuur werd afgefiltreerd, hetgeen heel gemakkelijk ging. Het filtraat was lichtgeel van kleur en reduceerde FEHLING's oplossing zwak. Het pectinezuur werd nu in 3 L. 80%-igen alcohol gebracht, waarin ik het een nacht liet staan. Daarna werd het zuur weer afgefiltreerd en net zoolang met alcohol gewasschen en op het waterbad met alcohol verwarmd tot geen zoutzuur meer met zilvernitraat was aan te toonen. Een gedeelte van het pectinezuur liet ik even drogen bij 30° C. tot de grootste hoeveelheid alcohol was verdampt en verwerkte deze hoeveelheid op het natriumzout. De rest van het pectinezuur werd met absoluten alcohol en daarna met absoluten aether gewasschen en daarna bij

35° C. aan de lucht gedroogd. Het aldus bereide pectinezuur werd nu wederom aan de reeds eerder genoemde analytische bepalingen onderworpen.

Hierbij werd naast een te verwaarloozen aschgehalte, en een gehalte aan methylalcohol = 0, voor het afgesplitste koolzuur 18,85% en een furfurolphoroglucide-opbrengst van 43,7% — beide weer berekend op de droge pectinestof — gevonden.

Daarnaast werd thans ook een elementair-analyse van het praeparaat verricht. Bij deze elementair-analyse, welke volgens de methode van TER MEULEN-HESLINGA werd verricht, werden de in tabel VI weergegeven cijfers verkregen.

TABEL VI.

Elementair-analyse van het uit citroenschillen bereide pectinezuur.

Afgewogen pectinezuur	Verkregen CO ₂	Verkregen H ₂ O	Berekend	
			C	H
58,35 mg.	88,0 mg.	25,05 mg.	41,2%	4,77%
58,1 mg.	87,4 mg.	25,6 mg.	41,0%	4,89%
	Gemiddeld		41,1%	4,83%

Van het pectinezuur heb ik voorts het aequivalentgewicht door titratie vastgesteld. Hierbij ging ik als volgt te werk: een zekere hoeveelheid droog pectinezuur werd in een overmaat 0,1 N. natronloog gebracht en daarna werd gewacht tot alles in oplossing was gegaan. Daarna werd de oplossing met 0,1 N. zoutzuur teruggetitreerd, waarbij phenolphthaleïne als indicator werd gebruikt.

Bij een tweetal bepalingen werden de volgende uitkomsten verkregen:

- 1e. Afgewogen 116,1 mgr. droog pectinezuur;
toegevoegd 50 cc. NaOH (0,1058 N.);
teruggetitreerd met 43,7 cc. HCl (0,1081 N.).

Omgerekend beteekent dit dat 1 gr. droog pectinezuur 4,87 cc N. loog verbruikt, waaruit een aequivalent gewicht van 205 volgt.

- 2e. Afgewogen 120,3 mgr. droog pectinezuur.
toegevoegd 50 cc. NaOH (0,1058 N.);
teruggetitreerd met 43,5 cc. HCl (0,1081 N.).

1 Gr. droog pectinezuur verbruikt dus 4,89 cc. N. loog, waaruit een aequivalent gewicht volgt van 206.

Het natriumzout van pectinezuur.

Voor de bereiding van het natriumzout van pectinezuur werd het zuur gesuspenderd in water. Er werd nu zeer voorzichtig NaOH bij gedruppeld tot de oplossing juist neutraal reageerde ten opzichte van phenolphthaleïne. Het natriumzout van het pectinezuur werd hierop met alcohol neergeslagen, vervolgens met alcohol en daarna met aether uitgewassen en in vacuum gedroogd.

In het aldus verkregen natriumzout bepaalde ik het natriumgehalte volgens de sulfaatmethode. Hierbij werden de volgende uitkomsten verkregen:

9,80% Na op droog pectaat,
en 9,83% Na op droog pectaat.
Gemiddeld 9,82% Na.

Het calciumzout van pectinezuur.

Voor de bereiding van het calciumzout werd op grond van de ervaring van CARRÉ en HAYNES, die vonden, dat het calciumpectaat bij toevoeging van CaCl_2 aan een oplossing van natriumpectaat beter neerslaat wanneer men in een met azijnzuur aangezuurde oplossing werkt als volgt te werk gaat.

Van de gele vloeistof, welke bij de bereiding van pectinezuur was verkregen door toevoeging van loog aan de oplossing van pectine werd $\frac{1}{2}$ L. met azijnzuur aangezuurd en vervolgens verdund tot 1 L. (het azijnzuur slaat het pectinezuur niet uit zijn zouten neer). Daarna werd iets meer dan de berekende hoeveelheid CaCl_2 -oplossing toegevoegd. Het mengsel liet ik even staan, waarna de vloeistof flink werd opgekookt en vervolgens gefiltreerd. In het filtraat werd nog eens met CaCl_2 geprobeerd of alle Ca-pectaat reeds was neergeslagen, wat inderdaad het geval bleek te zijn. Her neerslag, dat lang niet zoo gelatineus was als andere neergeslagen pectinestoffen, werd eenige malen met kokend water gewassen en opgekookt, tot het filtraat geen zoutzuurreactie meer vertoonde. Dan werd afgefiltreerd, met warmen 96%-igen alcohol, met absoluten alcohol en ten slotte met aether gewassen. Hierop werd het calciumpectaat in vacuum gedroogd.

In het aldus verkregen product bepaalde ik het calciumgehalte volgens de sulfaatmethode. Hierbij werden de volgende uitkomsten verkregen:

8,31% Ca op droog pectaat.
 8,37% Ca „ „ „ „
 Gemiddeld 8,34% Ca.

§ 5. Bereiding van het barium-galacturonaat uit citroenpectine.

Om de aanwezigheid van het galacturonzuur in de citroenpectine aan te toonen en om tevens een hoeveelheid galacturonzuur of één van zijn zouten in handen te krijgen, werd de volgende proefneming verricht.

Uitgegaan werd van citroenpectine, waarvoor ditmaal een handelspraeparaat van de „*Douglas Pectin Corporation*” in Rochester (N. Y.) werd gebruikt. Dit werd volgens het voorschrift van EHRlich en von SOMMERFELD gehydrolyseerd en verwerkt.

64 gr. van het pectinepraeparaat werden in 4 L. 2%-ig zwavelzuur opgelost en in een rondkolf met terugvloeikoeler gekookt. Opgemerkt werd, dat de aanvankelijk visceuze oplossing na eenigen tijd dun vloeibaar werd, waarbij evenwel een neerslag ontstond, dat vermoedelijk ongehydrolyseerd pectinezuur was. Dit pectinezuur werd bij langer koken ontleed in zijne bouwstenen, die op hun beurt weer oplostten in de zure vloeistof. Na een kookduur van ongeveer 10 uren was reeds een groot gedeelte van het pectinezuur op boven beschreven wijze in oplossing gegaan en werd de vloeistof van het toen nog aanwezige neerslag afgefiltreerd. Duidelijk was aan deze vloeistof de geur van furfural op te merken, hetgeen dus wees op een ontleding van het galacturonzuur of eventueel aanwezige pentose. De bruin gekleurde vloeistof werd nu verder, onder verhitting op het waterbad, met bariumcarbonaat geneutraliseerd, en daarna gefiltreerd, ontleurd met norit en in vacuum bij $\pm 30^{\circ}$ C. tot een volume van $\pm 0,5$ L. ingedampt. Deze vloeistof werd nog eens met norit ontleurd en daarna in 3 L. 96%-igen alcohol gedruppeld. Het bariumzout van het galacturonzuur sloeg hierbij als een ietwat geelachtig gekleurde vlokkige substantie neer en werd door een BÜCHNERTrechter afgefiltreerd. Het neerslag werd daarna nogmaals in water opgelost en weer neergeslagen met alcohol, waarna het,

nadat het gewasschen was respectievelijk met 96%-igen alcohol, absoluten alcohol en absoluten aether in vacuum werd gedroogd. Ik verkreeg op deze wijze ongeveer 26 gr. van een lichtgeel gekleurd praeparaat.

Het aldus verkregen praeparaat bleek bij droging bij 102° C.¹⁾ nog 8,65% vocht af te staan. Met het niet bij hooge temperatuur gedroogde praeparaat werden de in Hoofdstuk IV genoemde analyses verricht, waarbij dan het gevonden vochtgehalte in rekening werd gebracht. Er zij aan herinnerd, dat een tweetal bepalingen van het bariumgehalte leerden, dat het praeparaat 26,2% barium bevatte, hetgeen inderdaad de theoretische waarde is. Als verder bewijs voor de zuiverheid van het verkregen praeparaat kan het ook reeds vermelde feit dienen, dat de opbrengst aan furfurol-phloroglucide practisch volledig overeenstemde met de door EHRLICH en SCHUBERT voor hun praeparaat verkregen waarde. Deze beide waarnemingen, gecombineerd met het feit, dat het praeparaat bij oxydatie met salpeterzuur een belangrijke, zij het ook niet quantitative opbrengst aan slijmzuur gaf, spreken wel zeer ten gunste van de opvatting, dat het verkregen praeparaat inderdaad zuiver bariumgalacturonaat was.

Een poging, om het vrije galacturonzuur in gekristalliseerden toestand af te scheiden door omzetting van een tweede portie bariumgalacturonaat-oplossing met verdund zwavelzuur, leidde niet tot een resultaat. De verkregen stroop vertoonde na eenigen tijd staan in den exsiccator wel een begin van kristalvorming, doch de hoeveelheid der kristallen was niet voldoende voor een isolatie en identificatie.

§ 6. Interpretatie der resultaten en benadering van de constitutie van citroenpectine.

Terwijl in de vorige paragrafen een beschrijving is gegeven van de verschillende uit citroenschillen bereide pectinestoffen en van de bij de analyse daarvan verkregen uitkomsten zal er hier naar worden gestreefd de verkregen uitkomsten te interpreteren en te trachten daarbij een inzicht te verkrijgen in de constitutie dezer verbindingen.

¹⁾ EHRLICH droogt zijn bariumgalacturonaat bij 110° C, bij welke temperatuur bij mijn praeparaat evenwel een duidelijke caramelliseering optrad.

In de eerste plaats zij er dan op gewezen, dat achtereenvolgens voor de zure pectine, het daaruit bereide calciumzout en ten slotte voor het pectinezuur verschillende bepalingen zijn verricht, die er zich toe leenen om, wanneer men zich baseert op de studiën van EHRLICH en zijne medewerkers aangaande de constitutie van bieten- en vlaspectine, een inzicht te geven in het gehalte aan galacturonzuur, dat in mijne pectinepraeparaten aanwezig is. Indien men zich op het standpunt stelt, dat ook in de citroenpectine galacturonzuur de in quantitatief opzicht belangrijkste bouwsteen is, zal men toch mogen aannemen, dat met de koolzuurmethode van LEFÈVRE en TOLLENS een maat voor de aanwezige hoeveelheid galacturonzuur wordt verkregen. Men zou hiertegen kunnen aanvoeren, dat ook andere „uronzuren” onder de gegeven voorwaarden koolzuur zullen afsplitsen. Maar dan moet dadelijk worden opgemerkt, dat alle praeparaten bij oxydatie met salpeterzuur slijmzuur gaven, terwijl ook de in de vorige paragraaf medegedeelde waarnemingen geen twijfel overlaten, dat inderdaad galacturonzuur in de citroenpectinestoffen aanwezig is. Hoewel dit natuurlijk niet uitsluit, dat er naast galacturonzuur nog andere „uronzuren” aanwezig zijn, bestaat hiervoor anderzijds niet de minste aanwijzing, zoodat het voorshands toelaatbaar lijkt, het afgesplitste koolzuur geheel op rekening van galacturonzuur te stellen.

Wat nu de overige bouwstenen van de citroenpectinestoffen aangaat, kan in alle gevallen de in veresterden toestand aanwezige methylalcohol rechtstreeks worden bepaald. Verder hebben evenwel de onderzoekingen van EHRLICH en medewerkers als bouwstenen doen kennen van de uit bieten en vlas bereide pectinen: azijnzuur en verschillende suikers, zooals arabinose, xylose, fructose en galactose. Wat de eerstgenoemde stof betreft, zij opgemerkt, dat het mij niet gelukte volgens EHRLICH's voorschrift azijnzuur in citroenpectine aan te toonen, wat in overeenstemming is met de waarneming van NELSON, welke onderzoeker intusschen EHRLICH's waarneming voor bietenpectine althans kwalitatief kon bevestigen.

Een en ander maakt het waarschijnlijk, dat wat betreft de verdere bouwstenen van citroenpectine in de eerste plaats aan de genoemde suikers moest worden gedacht. De identificatie dezer eventueel aanwezige suikers alsmede de quantitatieve bepaling daarvan leverde intusschen groote moeilijkheden op. Het leek evenwel aangewezen, overeenkomstig EHRLICH's werkwijze, in de eerste

plaats een onderzoek in te stellen naar de aanwezigheid van pentosen, waarvan de quantitative bepaling met behulp van de weliswaar empirische furfurolmethode in het algemeen zeer wel uitvoerbaar is. In het onderhavige geval doet zich hierbij evenwel de complicatie voor, dat ook het galacturonzuur bij de bewuste destillatie met zoutzuur furfurol levert, zoodat de pentosebepaling een verschilbepaling wordt, waardoor de nauwkeurigheid uiteraard ongunstig wordt beïnvloed. Toch mocht verwacht worden, dat de nauwkeurigheid voldoende zou zijn om uit te maken of er naast galacturonzuur, pentose, eventueel aanwezigen veresterden methylalcohol en minerale bestanddeelen in de moleculen der citroenpectinestoffen nog plaats is voor andere bouwstenen.

In dezen gedachtengang heb ik voor de door mij geanalyseerde praeparaten: zure pectine, calcium-zout van zure pectine en pectinezuur, de gehalten aan calcium, methylalcohol, galacturonzuur en pentose op de hierboven ontwikkelde wijze berekend. Hierbij is nu, aangezien het galacturonzuur in het pectinezuur buiten twijfel anhydrisch gebonden is, het gevonden galacturonzuur als anhydride in rekening gebracht.

Indien wij deze berekening in de eerste plaats verrichten voor het best gedefinieerde pectinepraeparaat, het pectinezuur, dan komen wij tot het resultaat, dat daarin 85,4% galacturonzuuranhydride en 13,5% pentose aanwezig is, zoodat daarmee reeds 98,9% van het praeparaat is vastgelegd. Aan dit feit is vooral daarom waarde te hechten, omdat een eventuele onnauwkeurigheid in de galacturonzuurbepaling in genoemd opzicht onmiddellijk gecompenseerd wordt door een nagenoeg overeenkomstige wijziging in het pentosegehalte, waarvan de bepaling immers een verschilbepaling is.

Op grond hiervan lijkt er nu alle aanleiding om te besluiten, dat in het pectinezuurmolecule geen andere dan de beide genoemde bouwstenen: galacturonzuur en pentose aanwezig zijn. Gezien de nauwe verwantschap tusschen galacturonzuur en arabinose, is het het waarschijnlijkst, dat laatstgenoemde pentose aanwezig is.

Het scheen nu aangewezen om in verband met het feit, dat EHRlich zoowel in bieten- als in vlaspectine vier moleculen galacturonzuur heeft gevonden, terwijl NANJI, PATON en LING tot een zelfde slotsom voor een pectine van niet genoemde herkomst zijn gekomen, in de eerste plaats eens te berekenen wat de elementaire-

en de bouwsteen-samenstelling is voor een molecule, dat opgebouwd is uit vier moleculen galacturonzuur en één respectievelijk twee moleculen pentose. Gezien het feit, dat NANJI, PATON en LING het standpunt innemen, dat naast vier moleculen galacturonzuur één molecule arabinose en één molecule galactose aanwezig is, heb ik ook deze mogelijkheid nog in mijn berekening opgenomen. Bij de hieronder volgende berekeningen is nu voorts aangenomen, dat bij den opbouw van het pectinezuurmolecule uit n moleculen bouwsteen $n-1$ moleculen water zijn uitgetreden.¹⁾ Hiermede is bij de berekening der bouwsteen op deze wijze rekening gehouden, dat het galacturonzuur steeds als anhydride is opgenomen, terwijl de pentose in niet-anhydrischen vorm is berekend. In de hieronder volgende tabel VII zijn nu deze berekeningen voor de verschillende veronderstellingen verricht, waarbij tevens de percentages aan calcium en natrium der respectievelijke zouten zijn opgenomen. Ter vergelijking zijn in de onderste rij de door mij experimenteel bepaalde cijfers weergegeven.

Vergelijkt men nu de cijfers in tabel VII met elkaar, dan komt men tot de volgende conclusies:

1e. Wanneer men veronderstelt, dat er 4 moleculen galacturonzuur in het pectinezuurmolecule voorkomen, dan moet het moleculair-gewicht van mijn pectinezuur gelijk zijn aan $4 \times 205,2 = 821$, welke waarde dus ongetwijfeld het meeste overeenkomt met veronderstelling *a*.

2e. Uit de elementairanalyse zijn bij een dergelijk groot molecule geen vaste conclusie's te trekken. Zooals blijkt uit de berekende waarden voor het koolstofpercentage en het waterstofpercentage komen deze voor de verschillende veronderstellingen nagenoeg geheel met elkaar overeen. Toch kunnen wij voor het door mij gevonden cijfer voor de waterstof wel zeggen, dat dit het dichtst staat bij veronderstelling *a*.

3e. Uit de gevonden waarden voor het calcium- en natriumgehalte van de respectieve zouten kan ook de conclusie worden

¹⁾ Indien men, rekening houdende met het feit, dat EHRLICH en zijn medewerkers onder de onvolledige hydrolyseproducten van bieten- en vlaspectine ook digalacturonzuur van de formule $C_{12}H_{16}O_{12}$ hebben aangetroffen, zou willen aannemen, dat bij de vorming van het pectinezuurmolecule n of $n + 1$ moleculen water zijn uitgetreden, ondergaan de gegeven cijfers eenige veranderingen. De conclusie wordt daardoor evenwel niet aangetast.

TABEL VII.

Vergelijking van de voor uit citroenschillen bereid pectinezuur gevonden analysewaarden met die, welke behooren bij drie mogelijke veronderstellingen aangaande de constitutie van dit zuur.

Veronderstelling:	Formules	M	C	H	Percentage Ca in calciumzout	Percentage Na in natriumzout	Percentage galacturonzuur-anhydride	Arabinose
a. 4 galacturonzuur + 1 arabinose $-4 \text{ H}_2\text{O}$	$\text{C}_{29}\text{O}_{29}\text{H}_{42}$	854	40,8	4,92	8,61	9,76	82,4	17,6
b. 4 galacturonzuur + 1 arabinose + 1 galactose $-5 \text{ H}_2\text{O}$	$\text{C}_{35}\text{O}_{34}\text{H}_{52}$	1016	41,3	5,12	7,34	8,33	69,3	14,8
c. 4 galacturonzuur + 2 arabinose $-5 \text{ H}_2\text{O}$	$\text{C}_{34}\text{O}_{33}\text{H}_{50}$	986	41,4	5,07	7,54	8,56	71,4	30,4
d. <i>Gevonden waarden</i>		821	41,1	4,83	8,34	9,82	85,4	13,5

getrokken, dat deze het meest overeenstemmen met veronderstelling *a*.

4e. Het gehalte aan galacturonzuur klopt ook het meeste met veronderstelling *a*, al wijkt het daar dan ook nog 3% vanaf. Hierbij dient echter in aanmerking te worden genomen de betrekkelijk groote fout, welke bij deze koolzuurmethode kan worden gemaakt, aangezien de hoeveelheid uit galacturonzuur afgesplitst koolzuur kennelijk aan geringe schommelingen onderhevig is. Hiermee staat de gevonden waarde voor de pentose weer in direct verband, zoodat de te lage waarde, welke voor de pentose wordt gevonden, op deze zelfde oorzaak is terug te voeren.

Alles bij elkaar genomen wijzen de analyse-uitkomsten van het pectinezuur van de citroenen dus het meeste op een constitutie, als die welke in veronderstelling *a* is aangegeven.

Beschouwen wij thans van uit het standpunt, dat citroenpectinezuur een verbinding is van 4 moleculen galacturonzuur en 1 molecule arabinose de uitkomsten van de analyses der zure pectine en van het daaruit bereide calciumzout. Daarbij zij dan in de eerste plaats in herinnering gebracht, dat de onderzoekingen van von FELLEBERG geen twijfel laten, dat de eigenlijke pectinestoffen methylesters zijn van het pectinezuur. Intusschen pleegt in de geïsoleerde pectinestoffen de verestering nimmer volledig te zijn, wat dan meebrengt, dat de niet veresterde carboxylgroepen zich met calcium (of eventueel andere metalen als Mg) verzadigen.

In dit licht bezien moet de door mij bereide zure pectine, bij welker bereiding gestreefd is naar de isoleering van een aschvrije natuurlijke pectinestof, worden beschouwd als een mengsel van pectinestoffen, waarvan een belangrijk deel der carboxylgroepen met methylalcohol is veresterd en het overige deel in hoofdzaak vrij aanwezig is. De bereiding van het calciumzout, die beoogde deze carboxylgroepen met calcium te neutraliseeren, is blijkbaar nog met een geringe methylalcoholafplitsing gepaard gegaan, wat niet weg neemt, dat dit product als een mengsel van producten is te beschouwen, welke ieder voor zich een gemengd Ca-zout en methylester van pectinezuur zijn.

Er bestaat dus aanleiding om de analyse van deze producten te vergelijken enerzijds met die der „ideale” pectine, d. w. z. het volledig veresterde pectinezuur, anderzijds met het gemengd calciumzout-methylester van het pectinezuur.

De analyse van deze verbindingen, tezamen met de resultaten

der door mij van de beide producten verrichte analyses zijn in Tabel VIII samengevat.

TABEL VIII.

Vergelijking van de analysewaarden van een uit citroenschillen bereide zure pectine en het calciumzout hiervan met die van een volledig gemethoxyleerde pectine en die van een calciumzout van een dimethoxy-pectine.

Stof.	Ca	CH ₃ OH	Galac- turonz. anh.	Ara- binose	Totaal ¹⁾
1. Volledig gemethyleerde pectine .	0	14,1	77,3	16,4	100
2. Pectine met 1 Ca en 2 CH ₃ ...	4,3	6,95	76,5	16,3	100
3. Zure pectine	0,83	11,0	82,9	21,8	112,1
4. Ca-zout van zure pectine.....	2,78	7,1	79,5	21,7	109,1

Wij zien uit deze tabel dat, in aanmerking nemende de betrekkelijke onnauwkeurigheid der koolzuurmethode voor de galacturonzuur bepaling en de daarmee samenhangende onnauwkeurigheid der pentosebepaling en tevens realiseerende, dat het hier om een analyse van een niet-kristalliseerende substantie gaat, de cijfers voor het Ca-zout van zure pectine vrij bevredigend overeenstemmen met de opvatting, dat dit product een gemengd calciumzout en dimethylester van het pectinezuur is. Het te lage Ca-gehalte wijst er op, dat de neutralisatie met kalkwater niet geheel volledig is geweest.

Wat de zure pectine zelve aangaat, hierbij treft het hogere methylalcoholgehalte, dat intusschen niet de waarde van het volledig veresterde pectinezuur bereikt. De zure pectine heeft ongeveer een methylalcoholgehalte, dat beantwoordt aan een verestering van drie van de vier in het pectinezuur aanwezige carboxylgroepen. De overblijvende carboxylgroepen schijnen hardnekkig eenige minerale stoffen gebonden te houden. De analyse van de zure

¹⁾ Te bedenken is, dat bij het optellen der bouwsteen, het gegeven gehalte aan CH₃OH, in verband met de wateruittreding bij de verestering, slecht voor 15/32 in rekening moet worden gebracht. Ook het cijfer voor het Ca-gehalte ondergaat uit overeenkomstige overwegingen een geringe verlaging.

pectine laat zich dus niet geheel vergelijken met een der beide theoretische waarden. De verkregen uitkomsten voor de bouwsteen galacturonzuur en arabinose zijn blijkbaar wat te hoog. Neemt men evenwel de betrekkelijke onnauwkeurigheid der methoden in aanmerking, evenals het feit, dat deze niet-kristallijne verbindingen gemakkelijk met eenige procenten aan andere plantenstoffen kunnen zijn verontreinigd, dan kan men in de verkregen uitkomsten tot op zekere hoogte een steun zien voor de gegeven opvatting omtrent de constitutie van het pectinezuur en in het bijzonder voor het aangenomen verband tusschen dit zuur en de beide producten, welke de in de plant voorkomende pectinestoffen in samenstelling ongetwijfeld benaderen.

AANHANGSEL.

Bereiding en analyse van pectine uit suikerbieten.

Daar suikerbieten een veel goedkoopere grondstof zijn voor de pectinebereiding dan citroenschillen, werd ook hieruit een grotere hoeveelheid pectine bereid, in de hoop hierin een geschikte grondstof te vinden voor mijn proefnemingen aangaande de enzymatische omzettingen. Zooals in Hoofdstuk VII zal blijken, heeft de bietenpectine in dit opzicht niet aan haar doel beantwoord. Ik geef hieronder in het kort weer hoe ik bij de bereiding overeenkomstig het voorschrift van EHRlich en von SOMMERFELD ben te werk gegaan.

100 K.G. bieten werden gewasschen, door een bietenmolen gemalen, waarna de massa werd afgecentrifugeerd en in de centrifuge nog een paar maal met water werd nagespoeld. Daarna werden de snijdsels in een grooten geëmailleerden bak met gedestilleerd water bij een temperatuur van $\pm 55^{\circ}$ C. geëxtraheerd en deze extractie zooveel keer herhaald tot de extractievloeistof met α -naphthol geen koolhydraatreactie meer gaf. Tusschen de extracties werden de snijdsels telkens goed droog gecentrifugeerd en met water nage-wasschen. Na 7 extractie's kon men in het extract geen koolhydraten meer aantoonen. De zoo van suiker bevrijde snijdsels werden nu voor de pectinebereiding met kokend water eenige malen geëxtraheerd, telkens gedurende één uur. In de extractievloeistof was nu de hydropectine, dit is dus het mengsel van pectine en arabaan, opgelost. De vloeistof werd hierna tot een klein volume ingedampt en een klein gedeelte hiervan geheel tot droog ingedampt. De zoo verkregen droge geelbruine blaadjes hebben een vanilleachtigen geur en kunnen als de hydropectine van EHRlich worden beschouwd. Het tot ± 10 L. op een stoombad ingedampte extract werd nu met tweemaal de hoeveelheid 96 %-igen alcohol neergeslagen en gefiltreerd. Deze pectine liet zich gewoon door een papierfilter filtreren en het alcoholpraecipitaat was niet gelatineus. De pectine werd nog eens in water opgelost en weer met alcohol neergeslagen en gefiltreerd. Daarna werd vele malen met alcohol gewasschen, tenslotte met absoluten alcohol en absoluten aether, waarna ik de pectine als een zeer fijn poeder verkreeg. De opbrengst was

1500 gram van een nagenoeg wit poeder, dat zich bij bevochtiging bruin kleurde.

Van deze pectine werden eenige analyse's verricht teneinde een vergelijking te kunnen maken met de uitkomsten, welke bij de citroenpectine waren verkregen en om tevens mijne pectine te kunnen vergelijken met het Ca-Mg-zout van pectinezuur van EHRlich en von SOMMERFELD.

In tabel IX zijn nu achtereenvolgens de waarden aangegeven welke bij een aschbepaling, een methylalcoholbepaling, een koolzuurbepaling en een furfurolphoroglucidebepaling waren verkregen en welke weer in procenten zijn uitgedrukt.

TABEL IX.

Analyseresultaten van bietenpectine.

Stof	Asch	Op 100 dln. asch	CH ₃ OH	CO ₂	Furfurolphlorogl.
Droge bietenpectine	6,0	$\left\{ \begin{array}{l} 76,5 \text{ CaO} \\ 11,5 \text{ MgO} \\ 4,3 \text{ Fe}_2\text{O}_3 \end{array} \right.$	7,2	17,42	37,3

Vergelijken wij nu deze gevonden waarden met de opgaven van EHRlich en von SOMMERFELD, dan kan in de eerste plaats worden opgemerkt, dat het aschgehalte $1\frac{1}{2}\%$ hooger is dan dat van hun Ca-Mg-zout. Terwijl de hoofdbestanddeelen ook bij mijne aschanalyse, calcium en magnesium bleken te zijn, komen ze in een andere verhouding voor dan bij EHRlich, hetgeen afhankelijk kan zijn van de herkomst der bieten.

Voor het methoxylgehalte vonden bovengenoemde onderzoekers 6,65%, wat overeenstemt met 6,9% methylalcohol, hetgeen dus geen groot verschil uitmaakt met de door mij gevonden hoeveelheid. Opmerkelijk is intusschen, dat het methylalcoholgehalte van bietenpectine zooveel lager is dan dat van citroenpectine. Voor de furfurolphoroglucidebepaling en de koolzuurbepaling van deze bietenpectine konden in de publicatie van EHRlich en von SOMMERFELD geen cijfers worden gevonden waarmee bovenstaande waarden konden worden vergeleken.

Terwijl ik een galacturonzuuranhydridegehalte vond van 78,9% geven NANJI, PATON en LING voor een langs anderen weg bereide bietenpectine een gehalte op van 72,3 en 78,0%, waarbij evenwel te bedenken is, dat deze onderzoekers zonder bewijs aannemen, dat het galacturonzuur volledig koolzuur afsplitst. Neemt men den hiervoor door mij bepaalden factor in rekening, dan worden deze cijfers nog $\pm 12\%$ hooger.

Ook uit deze pectine bereidde ik de zure pectine en het pectinezuur benevens de respectievelijke calcium- en natriumzouten, alles geheel op dezelfde wijze als bij de citroenpectinestoffen is beschreven. Een volledig onderzoek van deze producten werd niet verricht; vermeld moge slechts worden, dat de bietenproducten in eigenschappen merkbaar van de citroenpectinederivaten afweken. Zoo was bijvoorbeeld het bietenpectinezuur vrij sterk in water oplosbaar, hetgeen in overeenstemming is met de ervaring van VON FELLEBERG. Aangaande de onveranderde bietenpectine, zij nog opgemerkt, dat het geleeringsvermogen bij vermenging met suiker en zuren zeer gering was, in tegenstelling met de citroenpectine. Voor de toepassing in de gelei-industrie komt de bietenpectine dus niet in aanmerking.

147
08
160

137
94
23

HOOFDSTUK VI.

VROEGERE ONDERZOEKINGEN OVER PECTASE.

§ 1. Onderzoekingen tot 1900.

Van de enzymen, die op pectinestoffen inwerken, is de pectase wel het meest bekend. Het was FRÉMY¹⁾, die in 1840 voor het eerst waarnam, dat pectine-oplossingen dikwijls „vanzelf” coaguleerden. Dit geschiedde volgens FRÉMY gewoonlijk, als de oplossing niet geheel zuiver was, en wel, wanneer ze „planteneiwit” bevatte. Hij vermoedde, dat de inwerking van dit planteneiwit op pectine te vergelijken was met die van emulsine op amygdaline.

FRÉMY bracht na deze ontdekking eene heldere, gezuiverde pectineoplossing in aanraking met een plantaardig eiwit, dat hij met alcohol uit het sap van vruchten of wortels had neergeslagen. Na eenigen tijd werd de massa slijmerig en zette zich weldra in eene geleachtige vaste stof om. De stof was niet meer oplosbaar in water, maar wel in alkaliën. Het planteneiwit verloor volgens FRÉMY pas door koken gedurende eenigen tijd het vermogen, om pectine in pectinezuur om te zetten. FRÉMY gaf aan dit planteneiwit den naam: *pectase*. Later spreekt hij er nog over, dat bij korte inwerking van pectase op pectine eerst *pectosinezuur* ontstaat, dat pas bij voortgezette inwerking van de pectase in *pectinezuur* overgaat.

Bij den overgang van pectine in pectinezuur vond geen gasontwikkeling plaats en deze omzetting was ook mogelijk bij afsluiting van lucht. Bij 30° C. vertoonde de pectase een maximale werking.

De pectase, die hij door neerslaan met alcohol uit het sap van jonge wortelen verkreeg en die dus vóór dien tijd in water oplosbaar was, werd door deze behandeling onoplosbaar in water, zonder daardoor hare werking op pectine te verliezen. Deze onoplosbare pectase gaf, wanneer men ze in water bracht en daarna af-filtreerde een filtraat, dat geen pectasewerking meer gaf en eene vaste stof, die wel de pectasewerking vertoonde.

¹⁾ E. FRÉMY, Ann. der Chemie 35, pag. 318, (1840); Ann. der Chemie und Pharmacie 67, pag. 257, (1848); Journ. de Pharm. et de Chim. 26, pag. 368, (1840).

FRÉMY neemt verder aan, dat de pectase ook reeds in de plant in twee modificaties: een in water oplosbare en een in water onoplosbare, kan voorkomen.

Wortelen (*Daucus Carota* L., *Beta vulgaris* L. enz.) zouden de oplosbare pectase bevatten; hun sap zou met pectine geleivorming geven. Appels en andere zure vruchten zouden geen oplosbare pectase bevatten; hun sap zou geen gelei met pectine geven. Ze zouden alleen onoplosbare pectine bevatten. Legde hij n.l. het vleesch van onrijpe appels in een pectine-oplossing dan nam hij waar, dat deze oplossing na korten tijd geleiachtig werd.

Plantengeleiën ontstaan volgens FRÉMY meestal, doordat de onoplosbare pectose door de vruchtenzuren in pectine wordt omgezet. De pectase van de vruchten lost inmiddels op en dit geeft dan met de pectine het geleiachtige pectinezuur. Laat men dus volgens FRÉMY vruchten, bijvoorbeeld appels, met water koken, dan verandert het appelzuur de pectose eerst in pectine en deze gaat onder invloed van pectase over in pectosinezuur, dat in het kokende sap oplost en dit bij afkoeling doet geleeren. FRÉMY staat hierbij dus op het standpunt, dat de pectase, ondanks het koken, hare activiteit zou behouden. Hij neemt hetzelfde aan ter verklaring van het verschijnsel, dat sommige gekookte vruchtensappen bij staan een gel geven. In een latere mededeeling herroept hij evenwel deze verklaringwijze, aangezien hij waarnam, dat het hierbij verkregen gel oplosbaar was in koud water.

Plantengeleiën kunnen toch ook volgens FRÉMY op vele andere manieren ontstaan, dus zonder dat hiervoor de aanwezigheid van pectase noodig is, bijvoorbeeld door verbinding van pectinezuur met in de vruchten voorkomende neutrale zouten. FRÉMY heeft op deze wijze dikwijls zeer consistente gels gekregen.

FRÉMY voert ook verschillende eigenaardige verschijnselen op pectase-werking terug, o. a. dat het sap van roode bessen met frambozensap vermengd een gelei geeft. Dit verschijnsel is volgens FRÉMY hiervan het gevolg, dat het frambozensap veel pectase bevat, welke op de pectine van de roode bessen inwerkt en ze omzet in het geleiachtig pectosinezuur.

Na FRÉMY hebben pas in 1894 BERTRAND en MALLÈVRE¹⁾ de

¹⁾ G. BERTRAND et A. MALLÈVRE, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 119, pag. 1012, (1894). Bull. de la Soc. Chim. de Paris 13, III, pag. 77, 252, (1895). Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 120, pag. 110, (1895); Ibid. 121, pag. 726, (1895).

pectasewerking voor het eerst weer nauwkeurig bestudeerd.

Zij bestrijden de opvatting van FRÉMY, dat er door inwerking van pectase op pectine een geleiachtig pectinezuur zou ontstaan. Zij zijn er eerder van overtuigd, dat het gevormde gel een calciumpectaat is, daar het niet oplosbaar is in verdunde alkaliën, maar wel, wanneer zij eerst met verdund zoutzuur het calcium hebben verwijderd.

Zij vermoeden dus, dat het calcium een rol zal spelen bij de „pectinefermentatie” en steunen deze opvatting door de volgende proeven.

In de eerste plaats wordt een pectase-oplossing bereid uit de kernen van jonge wortelen, door deze te malen en uit te persen. Deze pectase wordt calciumvrij gemaakt met behulp van alkali-oxalaat en daarna gefiltreerd. In de tweede plaats wordt eene pectine bereid, door uit het residu van de worteltjes de pectine met warm water te extraheeren en daarna met alcohol, die 2% zoutzuur bevat, neer te slaan. Voegen zij aan een oplossing der calciumvrije pectine eene calciumvrije pectase toe, dan treedt geen „coagulatie” in. Voegen zij nu echter aan deze calciumvrije pectase weer wat calciumchloride toe, dan verkrijgen zij met de pectine weer eene prachtige gelei.

Gekookt wortelsap en gekookte pectine leverden geen gel, evenmin, wanneer men hieraan een weinig calciumchloride toevoegde.

Noch de pectase, noch de kalk afzonderlijk waren dus in staat de pectine te coaguleeren. Calciumvrije pectine met calciumvrije pectase en calciumchloride coaguleerde echter vrij snel.

Barium, strontium en magnesium konden de rol van het calcium hierbij ook vervullen. Ze werkten echter minder sterk. Om nu te zien, welke gelei ze hadden verkregen (het zou namelijk mogelijk kunnen zijn, dat ze gewoon een geleiachtig zout van pectine hadden verkregen), behandelden ze het gel eerst met 1 à 2%-ig zoutzuur. Heeft men dan met een aardalkalizout van pectine te doen, dan zal alles oplossen, daar gewone pectine volledig oplosbaar is. Heeft men daarentegen met een zout van pectinezuur te doen, dan houdt men eene gelatineuze stof achter, het pectinezuur, dat onoplosbaar is. Het bleek, dat dit laatste het geval was met de stof, die men uit pectase en pectine verkreeg en deze stof bleek dus een aardalkalipectaat te zijn.

Het bleek den schrijvers verder, dat het ook niet onverschillig

was bij welken zuurgraad de pectase op de pectine inwerkte. Brachten zij 50 cc. van eene 2%-ige pectine-oplossing en eene gelijke hoeveelheid pectase-oplossing bij elkaar, dan coaguleerde dit mengsel in 48 minuten. Voegden zij hieraan echter van te voren 0,1 gr. zoutzuur toe, dan waren er 20 uur noodig, om ditzelfde mengsel te coaguleeren. Andere anorganische zuren vertraagden eveneens deze pectasewerking en ook organische zuren als citroenzuur en wijnsteen-zuur vertoonden dezelfde werking, alleen in minder sterke mate.

In de vruchten zelf zou, door de groote hoeveelheid zuur, die daar soms aanwezig is, de pectasewerking ook veelal langzaam verlopen.

Voor het geval, dat er veel aardalkalizouten aanwezig waren of een zeer geconcentreerde pectase, zou de vertragende werking van de zuren weer niet zoo sterk op den voorgrond treden. De „pectinefermentatie” hangt dus volgens BERTRAND en MALLÈVRE af van de relatieve verhouding van het enzyme, de aardalkalizouten en de vrije zuren. In het algemeen werkte de pectase het beste in neutrale oplossing.

Wat nu de onoplosbare pectase van FRÉMY betreft, meenen BERTRAND en MALLÈVRE het bestaan hiervan ten sterkste te moeten betwijfelen. FRÉMY had namelijk den invloed van de zuren niet opgemerkt bij de pectasewerking, en is daardoor tot de onjuiste conclusie gekomen, dat in appels en andere zure vruchten geen oplosbare pectase voorkwam. BERTRAND en MALLÈVRE konden in het sap dezer vruchten wel pectase aantoonen, door namelijk slechts voor een passenden zuurgraad zorg te dragen.

Zij merkten verder nog op, dat, wanneer men pectase met alcohol neersloeg, daarna weer in water bracht en direct weer filtreerde, de pectase geen tijd had om op te lossen. Liet men het neerslag langer in water staan, dan ging de pectase wel degelijk in oplossing. Verder is het volgens BERTRAND en MALLÈVRE mogelijk, dat FRÉMY somtijds door het neerslaan van de pectase met alcohol, het calcium in oplossing hield en zoo dus de pectase calciumvrij maakte en deze dus alleen al door het gemis aan calcium geen gel meer kon geven met de pectine.

De door FRÉMY gemaakte onderscheiding van oplosbare en onoplosbare pectase heeft dus volgens de genoemde onderzoekers geen reden van bestaan.

Zij hebben verder verschillende planten en plantendeelen op de al of niet aanwezigheid van pectase onderzocht. Het bleek hun, dat de pectase in zeer verschillende concentratie's kan voorkomen in verschillende planten en dat de pectase in het plantenrijk zeer verspreid is. Aardappelbladeren, klaver, luzerne e. a. gaven in eene versche oplossing met een gelijk volume van een 2%-ige pectine-oplossing reeds binnen 1 minuut coagulatie. Andere plantensappen, zooals die van de vruchten van de tomaten, gaven pas na 48 uren coagulatie. Het bleek hun voorts, dat de pectase in alle deelen van de plant voorkomt, zoowel in den wortel en in den stengel, als in de bloemen, de bladeren en de vruchten. In de bladeren werd evenwel verreweg de meeste pectase aangetroffen.

Zij veronderstelden daarom, dat de pectase in de bladeren zou worden gevormd en dat van hieruit in den tijd van het rijp worden van de vruchten, de pectase naar de vruchten zou worden getransporteerd.

Voor de bereiding van pectase gaven de onderzoekers de volgende methode aan, die ook heden ten dage nog veelal wordt toegepast.

De pectasehoudende bladeren worden eerst in een mortier goed opgewreven, daarna uitgeperst, waarna men het sap onder toevoeging van een weinig chloroform 24 uur in het donker laat staan. Daarna wordt het sap gefiltreerd, daar er zich een neerslag op den bodem heeft afgezet. Er wordt dan 2 maal het volume 90%-ige alcohol aan toegevoegd, waarbij eene witte stof neerslaat, die men direct weer oplost in zoo weinig mogelijk water. Na 12 uren wordt weer gefiltreerd en het filtraat wordt in een dunnen straal in eene groote hoeveelheid alcohol gegoten. De pectase, die neerslaat wordt afgefiltreerd en in vacuum gedroogd. Per Liter gefiltreerd sap verkrijgen zij zoo 5 à 8 gr. van eene witte stof, die niet hygroskopisch is en goed oplosbaar in water.

Duclaux¹⁾ bestrijdt in zijn „Traité de microbiologie” in 1899 de bewering van Bertrand en Mallèvre, dat het door de inwerking van pectase op pectine gevormde gel altijd een calciumpectaat is. Duclaux staat op het standpunt, dat het toegevoegde calcium slechts op een niet nader aangeduide wijze de pectasewerking ondersteunt. Het uitblijven van iedere coagulatie in de geheel calcium-vrij gemaakte oplossing van pectase en pectine schrijft hij toe aan een remmende werking van het in overmaat toegevoegde alkali-oxalaat.

¹⁾ E. Duclaux, Traité de microbiologie II, pag. 333, (1899).

§ 2. Nieuwere onderzoekingen.

GOYAUD¹⁾ weet in 1902 de pectasewerking reeds beter te verklaren. Als men namelijk volgens GOYAUD met kaliumoxalaat de pectase calciumvrij heeft gemaakt, dan zal er kaliumpectaat ontstaan, dat oplosbaar is en zoo zal dus het verschijnsel niet zijn waar te nemen. Men kan evenwel volgens GOYAUD aan de toename van den zuurgraad van het mengsel merken, dat de pectine ook onder deze voorwaarden eene verandering ondergaat, en hij trekt uit deze proeven de conclusie, dat de pectase met pectine pectinezuur geeft, en dat dit verschijnsel niet beïnvloed wordt door de al- of niet-aanwezigheid van calciumzouten.

N. BALL²⁾ verrichtte in 1913—'15 eenige onderzoekingen betreffende veranderingen der electriche geleidbaarheid gedurende de coagulatie van pectine. Hij werkte bij constante temperatuur en merkte op, dat gedurende de twee uren, die het mengsel van pectine en pectase noodig had, om geleidelijk in eene vaste gelei over te gaan, de weerstand van het mengsel practisch constant bleef. Hij meent hieruit te moeten besluiten, dat het product, dat bij de inwerking van pectase ontstaat, bestaat uit een sponsachtig netwerk, samengesteld uit een min of meer vaste phase, in de mazen waarvan eene meer vloeibare phase voorkomt.

BALL ging voorts de veranderingen in viscositeit van het mengsel tijdens de inwerking van pectase op pectine na. Hij merkt op, dat deze viscositeit na een bepaalden tijd een maximum vertoont, waarna ze weer snel daalt. Het mengsel begint dan eerst eenigen tijd later uit te vlokken. De reden voor den teruggang van de viscositeit moet volgens BALL gezocht worden in het feit, dat de colloïdale deeltjes samen gaan klonteren tot aggregaten, die van elkaar gescheiden zijn door eene vloeistof. Het klonteren van het gevormde gel hangt volgens BALL waarschijnlijk samen met de aanwezigheid van electrolyten.

Een nader bewijs voor deze opvatting ziet BALL in het feit, dat bij eene kleine toevoeging van electrolyten de snelheid van het klonteren wordt verhoogd, waarbij het maximum van de coagulatie in denzelfden tijd, maar bij een veel geringere viscositeit, wordt verkregen.

¹⁾ M. GOYAUD, *Compt. rend. de l'Acad. d. Sc.* 135, pag. 537, (1902).

²⁾ N. G. BALL, *Scient. Proc. Royal Dubl. Soc.* 14, pag. 349, (1913—'15).

Wat men tot nu toe de coagulatie van pectine heeft genoemd, moeten we ons volgens BALL dus samengesteld denken uit twee processen: ten eerste de geleering, dit is dus het visceuzer worden van de pectine-oplossingen en daarna de eigenlijke coagulatie.

Het is intusschen de vraag, of BALL's conclusie's over den invloed van de electrolyten wel volkomen gewettigd zijn. Hij heeft namelijk de pectine evenals de pectase met natriumhydroxyde geneutraliseerd en dit alleen verricht bij de proef, waarbij hij een electrolyt toevoegde. Deze loog is echter nooit heelemaal onschadelijk voor de pectine en zal een weinig natriumpectaat hebben kunnen vormen. De viscositeit na de pectasetoevoeging zal hierdoor ook wel reeds zijn beïnvloed, daar er dan minder pectine gecoaguleerd kan worden en het mengsel dus ook minder visceus zal worden. In ieder geval mag eene dergelijke proef niet vergeleken worden met eene, waarbij geen loog aan het mengsel is toegevoegd.

BALL doet verder nog metingen bij verschillende temperaturen (0° C., 14° C. en 21° C.). De hoogste van deze drie temperaturen geeft ook in den kortsten tijd coagulatie.

Een belangrijke opheldering van het wezen der inwerking van pectase op pectine is te danken aan de ontdekking van VON FELLEBERG¹⁾ in 1917, dat zich hierbij methylalcohol vormde. VON FELLEBERG heeft deze proef niet verder uitgewerkt, maar heeft met de ontdekking van dit verschijnsel den weg aangegeven, die ingeslagen kan worden, om een beter inzicht te verkrijgen in de pectasewerking.

TUTIN²⁾ spreekt eenige jaren later de meening uit, dat, evenals bij de inwerking van alkaliën op pectine, ook bij de pectasewerking aceton naast methylalcohol ontstaat. Wij zagen intusschen reeds in Hoofdstuk I, dat de meeste onderzoekers dit ontstaan van aceton niet kunnen bevestigen; alleen DAVISON en WILLAMAN³⁾ geven aan, het eveneens te hebben gevonden.

KOPACZEWSKI⁴⁾ publiceerde in 1925 een zeer uitgebreid onderzoek over het mechanisme der pectasewerking. Hij gebruikte bij zijn proefnemingen zeer zuivere uitgangsmaterialen. De pectine-oplossing werd gedialyseerd, ten eerste met behulp van water, daarna met

¹⁾ TH. VON FELLEBERG, *Bioch. Zft.* 85, pag. 45, (1918).

²⁾ F. TUTIN, *Bioch. J.*, 15, pag. 494, (1921); *Ibid.* 17, pag. 83, (1923).

³⁾ F. R. DAVISON and J. J. WILLAMAN, *Bot. Gaz.* 83, pag. 329, (1927).

⁴⁾ M. W. KOPACZEWSKI, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 7, pag. 419, (1925).

verdund zoutzuur, waarna dan nog eene electrolyse plaats had. De oplossing werd hierop in vacuum gedroogd bij lage temperatuur. De pectase, waarvan hij gebruik maakte, werd zeer zuiver gemaakt door herhaalde praecipitatie met alcohol en weer oplossen in water. Deze pectase werd dan nog op de volgende wijze gedemineraliseerd.

Een 5%-ige oplossing werd in een collodiumdialysator gebracht, totdat de geleidbaarheid van de buitenvloeistof constant bleef. De pectase-oplossing was nu niet meer met alcohol neer te slaan, de geleidbaarheid was $2,9$ à $3,9 \times 10^{-5}$, de oppervlaktespanning bedroeg $56,19$ en de viscositeit was $1,09$, terwijl de dichtheid $1,019$ was. Deze pectase-oplossing werd nu aan een electrolyse onderworpen. De pectasedeeltjes bewogen zich naar de anode en zijn dus blijkbaar negatief geladen. De op deze wijze verkregen vloeistof bleek nu niet meer in staat te zijn pectine te coaguleeren. Voegde hij het dialyseerbare gedeelte met de positieve lading weer aan de gedialyseerde pectase toe, of wel de asch van het gedialyseerde gedeelte of eenvoudig weg een oplosbaar calciumzout, dan herkreëg het enzyme zijne activiteit.

Zuivere, gedialyseerde pectase is dus volgens KOPACZEWSKI niet in staat zuivere, calciumvrije pectine te coaguleeren, maar hieruit mag niet worden besloten, dat de pectase de pectine onaangetast laat. Hij nam namelijk waar, dat het mengsel van zuivere pectine en pectase oogenblikkelijk coaguleert, wanneer er calciumzouten aan worden toegevoegd, terwijl anders voor de coagulatie toch altijd eenigen tijd noodig is.

KOPACZEWSKI heeft in plaats van calciumzouten ook verschillende andere zouten aan een dergelijk mengsel van zuivere pectine en pectase toegevoegd en dan de snelheid van coagulatie bepaald. Het bleek, dat koper- en ijzer-zouten zeer actief zijn, maar deze zouten coaguleeren de pectine ook zonder de aanwezigheid van pectase.

Voor de techniek van het onderzoek der pectasewerking is het niet zonder belang, dat door VON EULER en SVANBERG¹⁾ onderzoekingen zijn verricht ter bepaling van de optimale pH der pectasewerking. Voor pectinemateriaal maken zij gebruik van het sap van rijpe bessen van *Ribes nigrum*, *Ribes rubrum* en *Ribes grossularia*, in welk sap ook de pectase van nature aanwezig is. Door nu wisselende

¹⁾ H. VON EULER und O. SVANBERG, Bioch. Zft. 100, pag. 271, (1919).

hoeveelheden zoutzuur of natronloog aan dit sap toe te voegen en dan den coagulatielijd en tevens de pH te bepalen, kwamen zij tot de conclusie, dat deze coagulatielijd het kortst was bij een $pH = 4,3$. Zij spreken er evenwel niet over, op welk moment de pH wordt gemeten. Toch zal de begin- en de eind-pH in vele gevallen zeer verschillend kunnen zijn geweest; de ééne proefneming met het zeer zure sap, waarbij geen verandering in pH optrad, laat een generalisatie in dit opzicht niet toe. Verder kan de onzuiverheid van de oplossing, waarmee werd gewerkt en eveneens de toegevoegde natronloog zooveel invloed hebben uitgeoefend, dat men aan deze uitkomsten niet veel waarde kan hechten.

In 1920 verscheen voorts een verhandeling van WILLAMAN ¹⁾, waarin deze aangeeft, het voorkomen van pectase ook in een schimmelsoort te hebben vastgesteld. WILLAMAN besluit hiertoe, op grond van de waarneming, dat in een pectinehoudende cultuurvloeistof, waarop *Sclerotinia cinerea* was gegroeid, een gelei ontstond. Een soortgelijk verschijnsel was reeds eerder door COOLEY ²⁾ waargenomen bij den groei van *Sclerotinia cinerea* en van *Penicillium expansum* op een pectinehoudend medium, zonder dat deze onderzoeker daar intusschen de conclusie aan verbond, dat hier pectase in het spel zou zijn.

WILLAMAN constateerde daarbij, dat het gevormde gelei onoplosbaar was in warm water, oplosbaar evenwel in verdunde alkali en in verdund zuur. Indien dit laatste werkelijk het geval was, dan zou WILLAMAN's conclusie omtrent het voorkomen van pectase bij fungi weer op losse schroeven komen te staan.

Melding zij dan nog gemaakt van het onderzoek van NEUBERG en KOBEL ³⁾, die pectase in tabaksbladeren aantonden en die de rol van dit enzyme bij de tabaksfermentatie aan een bespreking onderwerpen.

Tenslotte verscheen na het beëindigen mijner eigen proefnemingen een verhandeling van DAVISON en WILLAMAN ⁴⁾, waarin nog eenige waarnemingen over het voorkomen van pectase zijn beschreven. Vermelding verdient nog slechts het feit, dat zij bij proefnemingen over den optimalen zuurgraad der pectase, de resultaten van EULER en SVANBERG niet kunnen bevestigen.

¹⁾ J. J. WILLAMAN, Bot. Gaz. 70, pag. 221, (1920).

²⁾ J. S. COOLEY, Ann. of the Miss. Bot. Garden 1, pag. 291, (1914).

³⁾ C. NEUBERG und M. KOBEL, Bioch. Zft. 190, pag. 232, (1927).

⁴⁾ F. R. DAVISON and J. J. WILLAMAN, Bot. Gaz. 83, pag. 329, (1927).

§ 3. Samenvatting.

Op grond van de voorafgaande onderzoekingen kunnen wij onze kennis van de pectase als volgt samenvatten.

Pectase is het enzyme, dat pectine een zoodanige verandering doet ondergaan, dat daaruit pectinezuur wordt gevormd. Een enkele waarneming van VON FELLEBERG maakt het waarschijnlijk, dat deze omzetting geheel op één lijn is te stellen met die, welke pectine onder den invloed van alkaliën resp. verdunde zuren bij verwarming ondergaat, d. w. z. dat deze omzetting zich beperkt tot een afsplitsing van veresterden methylalcohol. Indien calcium- of andere meerwaardige ionen aanwezig zijn, is het reactieproduct gekenmerkt door een geprononceerden geltoestand, die dus waarschijnlijk karakteristiek is voor de calcium- respectievelijk andere zouten van het pectinezuur.

Voorts moet worden opgemerkt, dat de pectase volgens de meeste onderzoekers een optimale werking in de nabijheid van het neutrale punt zou vertoonen, waartegenover staat, dat EULER en SVANBERG van meening zijn, dat de optimale zuurgraad van de pectasewerking overeenkomt met een $pH = 4,3$.

De pectase blijkt in hoogere planten zeer verspreid voor te komen, zoowel in bladeren, wortelen als in vruchten. Ook bij enkele schimmels is het voorkomen van pectase waarschijnlijk gemaakt.

HOOFDSTUK VII.

EIGEN WAARNEMINGEN OVER DE INWERKING VAN PECTASE OP PECTINEPRAEPARATEN.

§ 1. Inleidende opmerkingen.

Met de in de hieronder volgende paragrafen beschreven proefnemingen beoogde ik in de eerste plaats eenvoudige methoden aan te geven, welke zich er toe leenen het voorkomen van pectase in plantaardige extracten aan te toonen.

In de tweede plaats leek het mij van belang na te gaan, in hoeverre het door VON FELLEBERG geopende inzicht, dat de pectasewerking is terug te brengen op een afsplitsing van in de pectine aanwezigen veresterden methylalcohol er zich toe leende, om hierop een methode tot het vervolgen van het quantitatief verloop der pectasewerking te baseeren. Daarnaast kwam het mij wenschelijk voor nadere gegevens te verzamelen over de factoren, die den geleeringstijd van een pectine-pectasemengsel bepalen, zooals de concentratie van het substraat, die van het enzyme, de temperatuur en de waterstof-ionenconcentratie. Een bestudeering van de viscositeitsveranderingen, die zich hierbij afspelen, was — mede met het oog op de in het vorige Hoofdstuk vermelde uitkomsten van BALL — eveneens aangewezen.

§ 2. Methoden voor het aantonen van pectase.

Zooals uit het vorige Hoofdstuk blijkt berusten de tot dusver gebruikte methoden voor het aantonen van pectase uitsluitend op de daardoor in een pectineoplossing teweeggebrachte gelvorming, of de daarmede gepaard gaande viscositeitsverandering der pectineoplossing. Het is toch een merkwaardig verschijnsel, dat de door VON FELLEBERG min of meer terloops gedane waarneming aangaande het chemisme der pectasewerking tot dusver andere onderzoekers niet schijnt te hebben geïnspireerd tot een toepassing van deze waarneming voor het aantonen en quantitatief vervolgen der pectasewerking. Toch is het slechts rationeel om, nu het che-

misme der pectasewerking door VON FELLENBERG is gepreciseerd daarvan ook in genoemd opzicht ten volle profijt te trekken.

De omstandigheid, dat wij thans weten, dat de pectasewerking is terug te voeren op een splitsing van de in het pectinemolecuul aanwezige methylesters, biedt toch de mogelijkheid, om de pectasewerking te constateeren eenerzijds door de vaststelling van het ontstaan van zuurgroepen, anderzijds door het aantoonen van den afgesplitsten methyylalcohol.

Ik besloot thans de verschillende, mede op dit gezichtspunt te baseeren, methoden op hare bruikbaarheid te onderzoeken.

a. De gelatineeringsmethode.

Wat het kwalitatief aantoonen van pectase met behulp van deze methode aangaat, is verdere toelichting na hetgeen daaromtrent in het vorige Hoofdstuk is meegedeeld, wel overbodig. Ik overtuigde mij er van, dat het zeer wel uitvoerbaar is op deze wijze pectase in het sap van jonge wortelen en klaverbladeren aan te toonen, door een geringe hoeveelheid hiervan op een 2%-ige oplossing van mijn citroenpectine te laten inwerken. Inderdaad trad hierbij spoedig gelvorming in, die het mogelijk maakte de reageerbuisen om te keeren, zonder dat de inhoud er uit liep. Voor het overige verwijs ik naar § 4, waarin deze methode voor quantitative doeleinden is toegepast.

b. Methoden, welke op het directe aantoonen van de vorming van pectinezuur berusten.

De verhooging van den zuurgraad bij toevoeging van pectase aan pectine is op zeer fraaie wijze als volgt aan te toonen:

Een oplossing, die 10% gelatine en 1½% pectine bevat, wordt met eene geconcentreerde lakmoesoplossing sterk gekleurd en daarop geneutraliseerd met 0,1 N natronloog. De zoo verkregen oplossing giet men in een glasdoos met ingeslepen deksel tot een laag van ongeveer 3 mm. dikte en laat deze door afkoeling vast worden. Fig. 2 geeft een schematische teekening te zien van een dergelijke glasdoos met pectineplaat. Er wordt daarna een druppel van de op pectase te onderzoeken oplossing op de plaat gelegd en daarnaast voor de contrôle een druppel van dezelfde oplossing, nadat deze is opgekookt. De doos wordt omgekeerd geplaatst in een thermostaat bij ongeveer 17° C. In de doos op het deksel zet men een bakje met chloroform, om de ontwikkeling van micro-organismen op de plaat te verhinderen. Na één dag en nog beter

na eenige dagen, ziet men, indien de onderzochte oplossing pectase bevat om den druppel een roode vlek in de plaat ontstaan, welke daaromheen bovendien eenigszins opzwelt. Het spreekt van zelf, dat de intredende roodkleuring alleen dan tot de aanwezigheid van pectase in de onderzochte oplossing mag doen besluiten, indien een druppel van dezelfde oplossing, na opkoken, geen verandering op de lakmoesplaat teweeg brengt, dat wil zeggen uitsluitend in de plaat diffundeert en deze daarbij blauw blijft en niet opzwelt. Indien men zuur reageerende plantenextracten onderzoekt ligt het voor de hand, dat men dit extract tevoren voor-

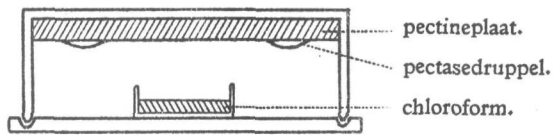


Fig. 2. Wijze van opstelling voor het aantonen van pectase met de pectineplaatmethode.

zichtig op lakmoes neutraliseert en de aldus verkregen vloeistof in verschen en in opgekookten toestand op de plaat brengt.

Indien men deze voorzorgen in acht neemt, mag een intredende roodkleuring en opzwellen van de lakmoesplaat door een niet opgekookten druppel worden toegeschreven aan de aanwezigheid daarin van pectase, welke de pectine onder vorming van pectinezuur ontleedt. De op zich zelf weinig waarschijnlijke mogelijkheid, dat de enzymhoudende vloeistof met de toegevoegde gelatine een zuurvorming zou geven, werd in tal van gevallen nagegaan door de te onderzoeken vloeistoffen geheel op dezelfde wijze te brengen op een lakmoesplaat met 10% gelatine, doch waaraan geen pectine was toegevoegd. In alle gevallen werd hierbij geen zuurvorming geconstateerd.

Plaat I, fig. 1 geeft een fotografie te zien van een lakmoesplaat, waarop eenige druppels waren gebracht van een uit de bladeren van spurrie (*Spergula arvensis* L.) geperst sap. De groote vlekken zijn afkomstig van de ongekookte pectase-vloeistof, en waren rood gekleurd, terwijl de kleinere donkere vlekken op de foto de plaatsen zijn, waar druppels van de gekookte pectase-vloeistof waren gebracht. Deze druppels diffundeerden zonder opzwellen of kleuring in

PLAAT I.

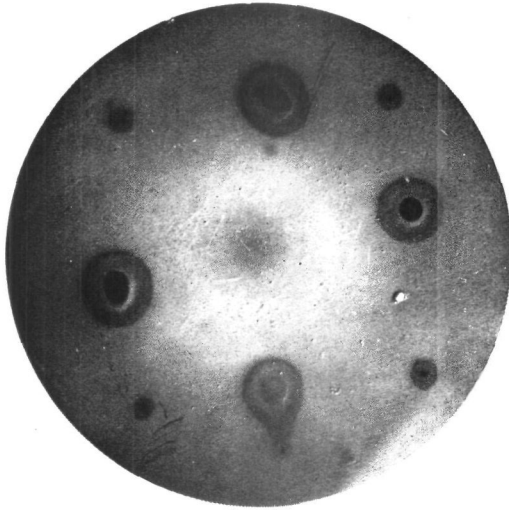


Fig. 1. Neutrale, met lakmoes gekleurde, gelatineplaat met 1,5 % pectine. De vier groote vlekken zijn de roode diffusievelden, welke zijn ontstaan door het op de plaat brengen van een druppel pectase-oplossing, bereid uit de bladeren van *Spergula arvensis* L. De vier tusscheningelegen kleine veldjes zijn afkomstig van het op de plaat brengen van druppels van de gekookte oplossing; de plaat had hier geen kleursverandering ondergaan.

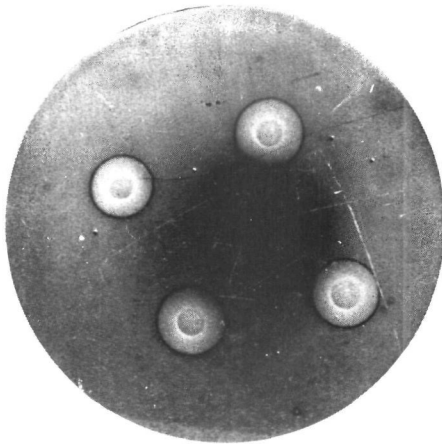
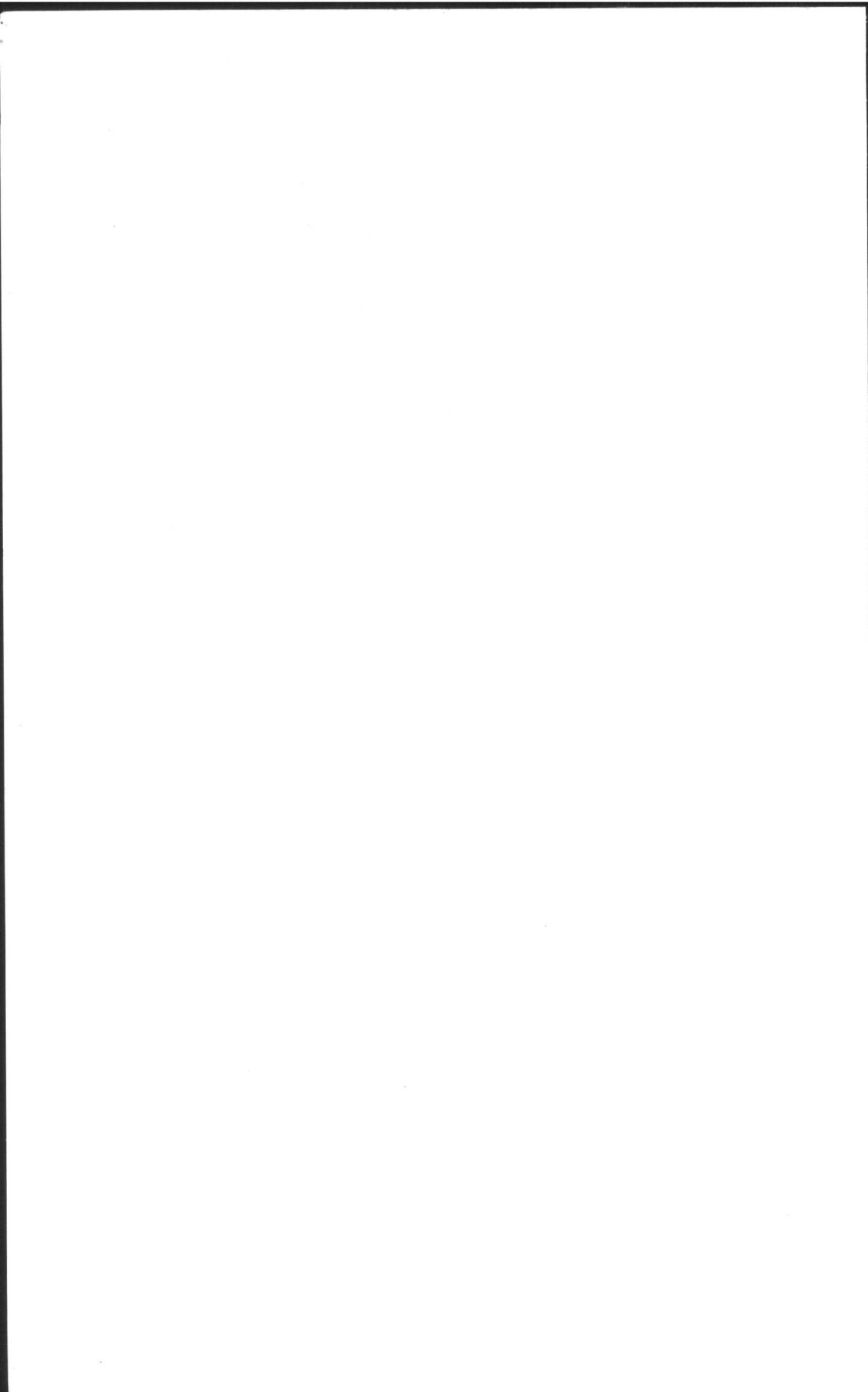


Fig. 2. Neutrale gelatineplaat met 1,5 % pectine en 0,04 % calciumnitraat. De vier witte velden (calciumzout van pectinezuur) zijn ontstaan door het op de plaat brengen van druppels eener pectase-oplossing bereid uit wortelen (*Daucus Carota* L.). De vier gelijktijdig op de plaat gebrachte druppels der gekookte oplossing hebben in de plaat geen waarneembare veranderingen teweeggebracht.



de plaat en lieten alleen een iets donkerder vlekje achter ter grootte van den oorspronkelijken druppel.

Ook op een andere wijze kan de vorming van pectinezuur bij de pectasewerking en daardoor de aanwezigheid van pectase in een op een pectineplaat gebrachten druppel van een te onderzoeken vloeistof worden aangetoond.

Aan 50 cc. van een oplossing, die 10% gelatine en 1½% pectine bevat, wordt 2 cc. van een 1%-ige calciumnitraatoplossing toegevoegd, waarna de oplossing wederom in een glasdoos wordt uitgegoten tot een laag van ongeveer 3 mm. dikte en men de massa door afkoeling vast laat worden. Wanneer men nu op deze plaat ongekookte en gekookte pectase brengt, dan ontstaat weer een groote opgezwollen ring rondom den ongekookten pectase-druppel, die tevens melkachtig troebel wordt. De gekookte druppel diffundeert daarentegen bijna onzichtbaar in de plaat.

De genoemde melkachtige troebeling is nu op deze wijze te verklaren, dat de pectine en het gedeeltelijk wellicht aanwezige Ca-zout van pectine oplosbare verbindingen zijn en dus de plaat doorschijnend laten. Voegt men nu hieraan pectase toe, dan zal zich daar ter plaatse het calciumzout van pectinezuur vormen, dat onoplosbaar is en plaatselijk een wit veld zal doen ontstaan.

Plaat I, fig. 2 laat een fotografie zien van een dergelijke pectineplaat, waarop eenige ongekookte en gekookte druppels van een wortelpectasevloeistof waren gebracht. De 4 ongekookte druppels zijn door de witte velden en de veroorzaakte opzwellings duidelĳk waar te nemen. De 4 gekookte druppels, die daar tusschen in liggen, zijn nauwelĳks meer terug te vinden.

Met de beide onder *b* beschreven methoden heb ik nu een aantal waarnemingen verricht omtrent de verspreiding van pectase in verschillende plantendeelen. Onderzocht werden zoowel wortelen als bladeren en vruchten en reeds dadelĳk zij opgemerkt, dat ik in overeenstemming met de uitkomsten van BERTRAND en MALLÈVRE de pectase zeer algemeen verspreid aantrof.

Ik ging bij dit onderzoek als volgt te werk. De verschillende plantendeelen werden eerst in een mortier met chloroform opgewreven, waarna het sap door een neteldoek werd uitgeperst. Dit sap werd dan met 0,1 N natronloog op lakmoes geneutraliseerd en hiervan een druppel op de platen gebracht. Steeds werden contrôleproeven verricht met opgekookt geneutraliseerd sap.

Onderstaand lijstje geeft een overzicht van de verkregen resultaten, waarbij ik de mate der pectasewerking heb weergegeven door het gebruik van de cijfers 0 tot 4, waarbij 0 dus aangeeft, dat geenerlei inwerking plaats vond, terwijl 4 een maximale pectasewerking aanduidt.

wortelen	{	gewone wortel (<i>Daucus Carota</i> L.)	→	4
van		knolraap (<i>Brassica campestris</i> L.)	→	3
bladeren	{	klaver (<i>Trifolium repens</i> L.)	→	4
		luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.)	→	4
		spurrie (<i>Spergula arvensis</i> L.)	→	4
		knolraap (<i>Brassica campestris</i> L.)	→	3
		aardappel (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	→	3
vruchten	{	duindoorn (<i>Hippophaë rhamnoides</i> L.)	→	0
		hulst (<i>Ilex aquifolium</i> L.)	→	2
		dwergmispel (<i>Cotoniaster Simonsii</i> Hort. ex Bak.)	→	2
		dwergmispel (<i>Cotoniaster horizontalis</i> Dcs.)	→	..	1
		<i>Skimmia japonica</i> Thunbg.	→	2

Uitdrukkelijk zij opgemerkt, dat alle contrôleproefnemingen met gekookte sappen negatief verliepen.

c. *De op het aantonen van afgesplitsten methylnalcohol berustende methode.*

Deze methode, welke wellicht het scherpste bewijs voor een in-tredende pectasewerking oplevert, staat in eenvoudigheid van uitvoering bij de eerdergenoemde methode ten achter en is dan ook door mij voor kwalitatieve doeleinden niet toegepast. Voor een quantitatief vervolgen der pectasewerking is zij evenwel bij uitstek geschikt en in de hieronder volgende paragraaf zal dan ook verslag worden uitgebracht over enkele toepassingen in dit opzicht.

§ 3. *Bestudeering van het verloop der pectasewerking, met behulp van de methylnalcoholmethode.*

Terwijl VON FELLEBERG, zooals reeds opgemerkt, er mede volstaan heeft de methylnalcohol-afsplitsende werking van de pectase terloops aan te toonen, leek het mij van belang deze afsplitsing te gebruiken om het verloop der pectasewerking quantitatief te vervolgen.

Voor de quantitative bepaling van den methylalcohol gebruikte ik de door VON FELLEBERG aangegeven methode, welke deze heeft toegepast bij de bestudeering van de inwerking van alkaliën op pectine. Voor deze methode kan worden verwezen naar hoofdstuk IV § 3.

Bij de hieronder volgende proefnemingen stelde ik mij tot doel het snelheidsverloop van de pectase-werking bij verschillende temperaturen na te gaan en in het bijzonder ook vast te stellen, of de methylalcoholafplitsing onder den invloed der pectase op den duur even volledig plaats heeft als bij de inwerking van verdunde alkaliën.

Bij al deze proefnemingen werd gebruik gemaakt van éézelfde citroenpectine-praeparaat. Teneinde hierin het totale gehalte aan veresterden methylalcohol te bepalen, werden 20 cc. van de 2%-ige pectineoplossing even opgekookt met een kleine overmaat natronloog (ongeveer 13 cc. 0,1 N NaOH) in een rondkolfje, waarop een terugvloeikoeler was aangebracht. Aan de zwak alkalisch reagerende vloeistof werd zooveel verdund zoutzuur toegevoegd, tot een zwak zure reactie was verkregen en het pectinezuur dus neersloeg. Nadat de vloeistof tot precies 60 cc. was aangevuld — teneinde een zelfde verdunning te verkrijgen als bij de hieronder te beschrijven proefnemingen aangaande de pectasewerking — werden nauwkeurig 40 cc. afgedestilleerd. Het aldus verkregen destillaat, dat, zooals contrôleproefnemingen leerden, allen in de oorspronkelijke vloeistof aanwezigen methylalcohol bevatte, werd nu volgens de methode van VON FELLEBERG op zijn methylalcoholgehalte onderzocht. Hierbij bleek, dat de gebruikte pectine 7,05% veresterden methylalcohol bevatte.

Voor de proefnemingen aangaande de pectasewerking werd gebruik gemaakt van een pectase-oplossing, die verkregen was door uitpersing van de kernen van ingekulde wortelen. Het aldus verkregen sap werd met chloroform geconserveerd en werd na drie dagen staan gebruikt. Tijdens het staan vormde zich nog een geringe hoeveelheid neerslag. De bovenstaande pectase-oplossing was een prachtig heldere, lichtgele vloeistof.

Ten einde nu het verloop der pectasewerking na te gaan, werd in een geheele reeks rondkolfjes 20 cc. van de 2%-ige pectine-oplossing en 40 cc. van de pectase-oplossing gebracht. Eén van deze kolfjes werd snel tot kookhitte verwarmd, waarmede ongeveer

1 à 2 minuten gemoeid waren en hiervan op de boven aangegeven wijze 40 cc. afgedestilleerd en de daarin aanwezige methylalcohol bepaald. Na gezette tijden werd deze bewerking met één der andere kolfjes herhaald.

Een dergelijke reeks proefnemingen werd bij vier verschillende temperaturen n.l. bij 14° C., 33° C., 44° C. en 60° C. verricht. De bij deze proefnemingen verkregen uitkomsten zijn in tabel X samengevat, waarbij de hoeveelheden van den, door de pectase-werking afgesplitsten methylalcohol steeds in procenten van de aanvankelijk aanwezige pectinehoeveelheid is uitgedrukt. Opgemerkt zij,

TABEL X.

Snelheid van de methylalcoholafplitsing bij de inwerking van wortel-pectase op citroenpectine bij verschillende temperaturen.

Tijd	Hoeveelheid afgesplitste methylalcohol bij 14° C. in % van de pectine	Hoeveelheid afgesplitste methylalcohol bij 33° C. in % van de pectine	Hoeveelheid afgesplitste methylalcohol bij 44° C. in % van de pectine	Hoeveelheid afgesplitste methylalcohol bij 60° C. in % van de pectine
1 min.	1,2	3,8	4,1	—
5 "	—	—	—	2,45
10 "	—	—	4,9	—
15 "	—	—	—	4,1
20 "	—	4,25	—	—
30 "	1,5	—	5,6	3,8
1 uur	—	4,5	—	—
1 ¹ / ₄ "	1,7	—	—	—
2 "	3,0	—	5,9	3,7
3 "	3,2	5,5	—	—
4 "	3,4	—	—	—
5 "	4,0	—	—	—
5 ³ / ₄ "	—	—	6,5	—
6 "	—	5,7	—	—
17 ¹ / ₂ "	4,7	—	—	—
46 "	4,9	—	—	—
48 "	—	5,9	7,05	—

dat zoowel het gebruikte rondkolfje als de pectine- en de pectase-oplossing steeds te voren afzonderlijk op de bewuste temperatuur waren gebracht, zoodat de reactie dadelijk bij de gewenschte temperatuur intrad. De in de onmiddellijk opgekookte vloeistof aangetroffen hoeveelheid methylalcohol is in de tabel bij benadering weergegeven als de hoeveelheid, die na 1 min. inwerking bij de bewuste temperatuur ontstaat.

Vermelding verdient, dat tevens de volgende blanco proefnemingen werden verricht:

1e. 20 cc. pectineoplossing en 40 cc. water werden direct afgedestilleerd.

2e. 40 cc. pectaseoplossing en 20 cc. water werden ook direct afgedestilleerd.

3e. 20 cc. gekookte pectineoplossing en 40 cc. gekookte pectaseoplossing bleven 20 uren staan en werden vervolgens afgedestilleerd.

In geen van de drie gevallen kon ook maar een spoor methylalcohol in het destillaat worden aangetoond.

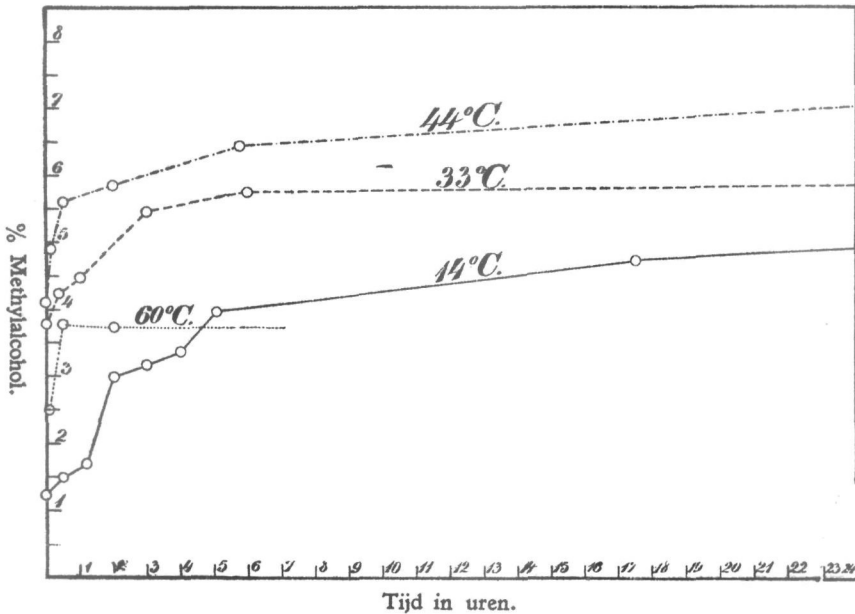


Fig. 3. Verloop van de methylalcoholafplitsing bij de inwerking van pectase op citroenpectine bij verschillende temperaturen.

De in tabel X samengevatte resultaten zijn ook in fig. 3 grafisch weergegeven.

Wij mogen uit de verkregen uitkomsten besluiten, dat van de onderzochte temperaturen 44° C. de snelste inwerking van de pectase te zien geeft. Bij 60° C. treedt blijkbaar een snelle vernietiging van het enzyme in, zoodat de hoeveelheid afgesplitste methylalcohol reeds na 15 minuten niet meer toeneemt. Toen dit uit een voorproef was gebleken, werd er bij de eigenlijke proefnemingen voor zorg gedragen, dat de proefneming onmiddellijk werd ingezet, nadat de pectase de temperatuur van 60° C. had bereikt om een voorafgaande inactivering der enzymoplossing zooveel mogelijk te voorkomen.

Belangrijk is, dat bij 44° C. de inwerking blijkbaar volledig is verlopen, aangezien de hoeveelheid afgesplitste methylalcohol dezelfde is als die, welke bij de alkalibehandeling uit de pectine werd verkregen. Dat dit bij de andere onschadelijke temperaturen niet het geval is, is een punt dat nadere opheldering vereischt.

§ 4. Proefnemingen over de geleeringssnelheid van pectine-oplossingen.

Naast de in de vorige paragraaf beschreven waarnemingen over het snelheidsverloop der pectasewerking scheen het van belang eenige proefnemingen te verrichten over de snelheid, waarmede de geleering van pectine-oplossingen onder den invloed van pectase verloopt. Deze geleeringstijd toch wordt door verschillende onderzoekers als maat voor de pectasewerking gebruikt.

In de eerste plaats besloot ik na te gaan, welke de invloed van een toenemende pectaseconcentratie op den geleeringstijd van een pectine-oplossing bij gelijkblijvende pectineconcentratie was. Hiertoe werden in reageerbuizen 5 cc. van een 1%-ige oplossing van citroenpectine gebracht en vervolgens in elk van deze een mengsel van een afnemende hoeveelheid eener wortelpectase-oplossing en zooveel water, dat het toegevoegde volume steeds 10 cc. bedroeg. De proefnemingen geschieden bij een kamertemperatuur van 16° C. Er werd nu nagegaan na welken tijd de inhoud van de reageerbuis zoo vast was geworden, dat deze kon worden omgekeerd, zonder dat de massa er uit liep.

TABEL XI.

Verband tusschen de pectaseconcentratie en den geleeringstijd eener pectine-oplossing onder den invloed van dit enzyme.

Aan 5 cc. 1%-ige pectine-oplossing toegevoegd:		Pectase-concentratie.	Geleeringstijd in minuten.
pectase-opl. in cc.	water in cc.		
10	0	0,67	25
9	1	0,6	21 (?)
8	2	0,53	30
7	3	0,47	32
6	4	0,4	45
5	5	0,33	90
4	6	0,27	480
3	7	0,2	∞
2	8	0,13	∞
1	9	0,07	∞

Wij zien hieruit, dat, zooals te verwachten was, de geleeringstijd bij afnemende pectaseconcentratie merkbaar verlengd wordt, om tenslotte zelfs oneindig groot te worden. Het trekt evenwel de aandacht, dat er van een lineaire betrekking tusschen geleeringstijd en pectaseconcentratie geen sprake is, hetgeen het vermoeden wettigt, dat de geleeringstijd een zeer onvolkomen maat voor de pectasewerking is.

In de tweede plaats ging ik na, welken invloed de pectineconcentratie bij gelijkblijvende pectaseconcentratie op den geleeringstijd uitoefent.

Ik ging bij deze proefnemingen als volgt te werk:

In reageerbuizen werden 10 cc. van de ook bij de vorige proefneming gebruikte wortelpectase en 10 cc. van een oplossing van citroenpectine in telkens afnemende concentratie vermengd. Aan de oplossingen was een kleine hoeveelheid van den universeel-indicator (B. D. H.) toegevoegd, waardoor het mogelijk was de

pH onmiddellijk na het vast worden bij benadering vast te stellen. De aanvangswaterstofionenconcentraties der verschillende mengsels bleken slechts weinig te varieeren. In het mengsel dat 1% pectine bevatte, kwam deze overeen met een pH = 6. De oplossingen met geringere pectineconcentratie vertoonden een eenigszins afnemenden zuurgraad, welke in de aan pectine armste oplossing overeenkwam met een pH = 6.5. De proefnemingen geschieden bij een kamertemperatuur van 16° C. De verkregen uitkomsten zijn in tabel XII samengevat.

TABEL XII.

Verband tusschen den geleeringstijd eener pectine-oplossing onder den invloed van pectase en de beginconcentratie van de pectine.

Beginconcentratie der pectine in procenten.	Geleeringstijd in minuten.	pH na ingetreden geleering.
1	70	3
0,9	40	3
0,8	27	3,5
0,7	22	3,5
0,6	11	3,5
0,5	8	3,5
0,4	10	4
0,3	10	4,5
0,2	10	5
0,15	∞	5,5
0,1	∞	6
0,05	∞	6,5

Wij zien uit deze tabel, dat bij een pectineconcentratie van 0,15% geen gelvorming meer plaats vindt. Duidelijk blijkt voorts, dat de geleering bij zeer uiteenlopende waterstofionenconcentratie's (pH varieerende van 3 tot 5) kan plaats vinden. Zeer merkwaardig is evenwel het feit, dat de geleeringstijd bij de hoogste gebruikte pectineconcentratie belangrijk langer is dan bij een beginconcentratie aan pectine van 0,5%. Toch lijdt het geen twijfel — en de waar-

genomen eindzuurgraad levert hiervan een bevestiging — dat in de 1%-ige pectineoplossing een grootere hoeveelheid pectine in pectinezuur is omgezet dan in de oplossingen met lagere aanvangsconcentratie der pectine. Wij moeten hieruit concludeeren, dat een overmaat pectine het geleeren van bij de inwerking gevormd pectinezuur vertraagt. Uit een en ander volgt onmiskenbaar, dat het in het algemeen niet toelaatbaar is den geleeringstijd — zooals veelal geschiedt — als maat voor de pectasewerking te bezigen.

§ 5. De viscositeitsverandering, welke een pectine-oplossing onder den invloed van pectase ondergaat.

Zooals in Hoofdstuk VI is vermeld, zijn door BALL (l. c.) waarnemingen verricht omtrent de viscositeitsveranderingen, welke een pectine-oplossing onder den invloed van pectase ondergaat. Deze onderzoeker constateerde daarbij het merkwaardige feit, dat deze viscositeit aanvankelijk geleidelijk steeg, om daarna een vrij plotseling aanzienlijke vermindering te ondergaan, waarna eerst een uitvlokken volgde.

Ik besloot deze waarnemingen te herhalen.

Bij deze proefnemingen maakte ik gebruik van een viscosimeter van OSTWALD, welke in een waterthermostaat op een constante temperatuur werd gehouden.

Bij de eerste proefneming werd 5 cc. 2% citroenpectine vermengd met 5 cc. klaverpectase en 5 cc. water en hiervan na goed doorenmengen 10 cc. in den viscosimeter gebracht en de doorstroomingssnelheid bepaald. Dit werd dan na verschillende tijden herhaald, totdat de massa duidelijk klonterde, waardoor nauwkeurige waarnemingen onmogelijk werden.

De resultaten van deze bij 31° C. verrichte proefneming zijn in Fig. 4 graphisch weergegeven. In tegenstelling met de waarnemingen van BALL is dus hier van een ombuigen der kromme geen sprake.

Ik verrichtte nog een tweede proefneming, waarbij ik ditmaal bietenpectine gebruikte. Uit voorloopige proeven bleek mij, dat het hierbij noodig was om de pectineconcentratie aanmerkelijk hooger te nemen. Bij de eigenlijke proefneming vermengde ik 7,5 cc. 8% oplossing van bietenpectine met 7,5 cc. klaverpectase-oplossing. Ook thans werd 10 cc. van het mengsel in den viscosimeter gebracht. De temperatuur was 32° C. Het verloop van de uitvloeitijden als

functie van den tijd is in Fig. 5 weergegeven. De kromme vertoont eenzelfde gedaante als die van Fig. 4.

Daar BALL met een uit jonge bladeren van *Syringa vulgaris* bereid pectasepraeparaat heeft gewerkt, heb ik ook nog een proefneming met een uit deze bladeren bereid enzymextract verricht. Hierbij werd een mengsel van 5 cc. 2% citroenpectine, 5 cc. seringpectaseoplossing en 5 cc. water gebruikt, waarvan weer 10 cc. in den viscosimeter werd gebracht. De temperatuur der proefneming bedroeg ditmaal 14° C.

Zoals uit Fig. 6 blijkt, werd ook hier slechts een geleidelijke stijging van de viscositeit waargenomen.

Het door BALL beschreven verschijnsel heb ik dus niet kunnen terugvinden, zonder dat het mij mogelijk is een verklaring voor deze afwijking te geven. Voor het overige kan aangaande de ge-

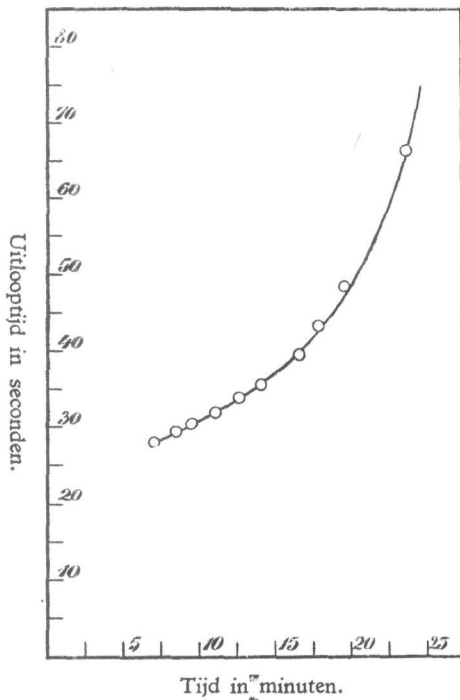


Fig. 4. Verloop van de viscositeitsveranderingen van een oplossing van citroenpectine onder den invloed van klaverpectase bij 31° C.

daanten dezer krommen slechts worden opgemerkt, dat deze groote overeenkomst vertoonen met de krommen, welke het verband tusschen de concentratie van een lyophiel kolloïd en de viscositeit weergeeft.

Men zou geneigd zijn hieruit te besluiten, dat het verloop der omzetting in het beschouwde gebied een lineaire functie is van den tijd. Toch is in dit opzicht groote voorzichtigheid geboden, omdat de vroegere waarnemingen aannemelijk maken, dat de viscositeit van het product der pectasewerking ook door de nog aanwezige pectineconcentratie wordt beïnvloed. Daarbij komt nog, dat de reactie ook onder vorming van zuurgroepen verloopt, zoodat de waterstofionenconcentratie tijdens het verloop een voortdurende stijging ondergaat.

Teneinde den invloed van dezen laatsten factor te ontgaan en tevens na te gaan bij welke waterstofionenconcentratie de geleerende

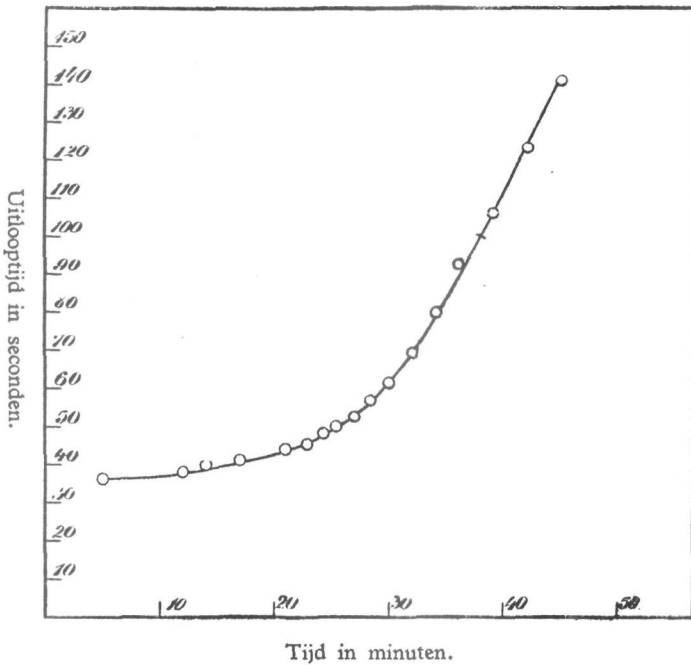


Fig. 5. Verloop van de viscositeitsveranderingen van een oplossing van bietepectine onder den invloed van klaverpectase bij 32° C.

werking der pectase optimaal is, was het aangewezen de proefnemingen te herhalen in op verschillende pH's gebufferde media.

Ik heb er dus naar gestreefd bufferoplossingen te vinden, die althans binnen den voor de proefnemingen benodigden tijdsduur op zich zelf geen verandering in de viscositeit der pectineoplossing teweegbrachten en welke met de in het reactiemedium aanwezige

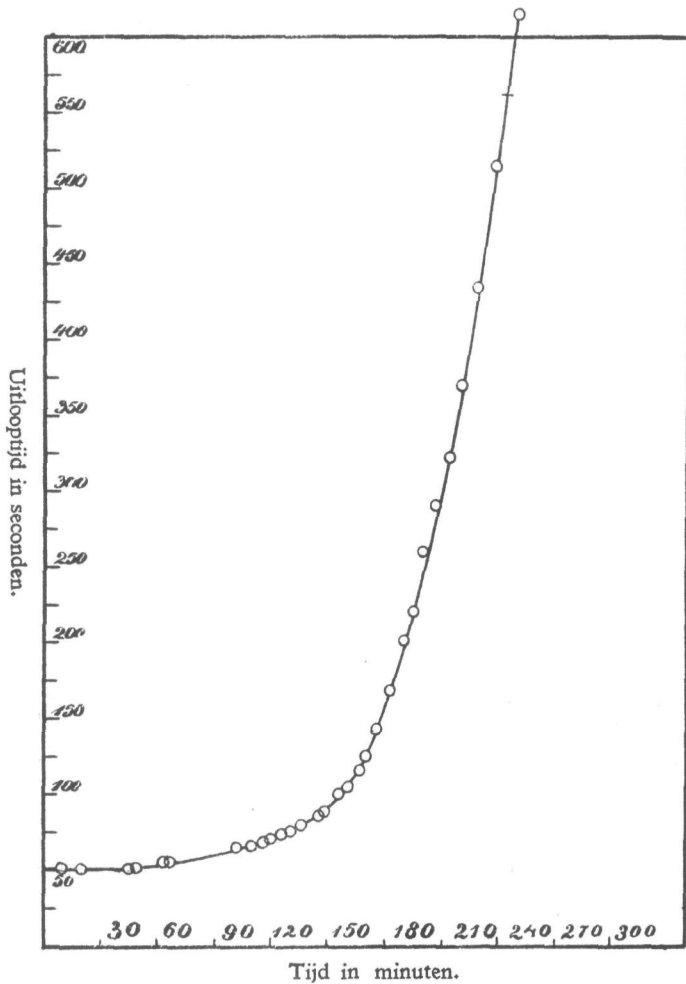


Fig. 6. Verloop van de viscositeitsveranderingen van een oplossing van citroenpectine onder den invloed van seringpectase bij 14° C.

stoffen ook niet zoodanige omzettingen ondergaan, dat daardoor een verandering in de waterstofionenconcentratie plaats heeft.

De eenige bufferoplossingen, die mij aan deze vereischten bleken te voldoen, waren de door CLARK aangegeven mengsels van natrium-acetaat en azijnzuur, waarmede intusschen slechts het beperkte gebied tusschen pH : 4,6 en 5,6 kon worden bestreken. Deze brachten

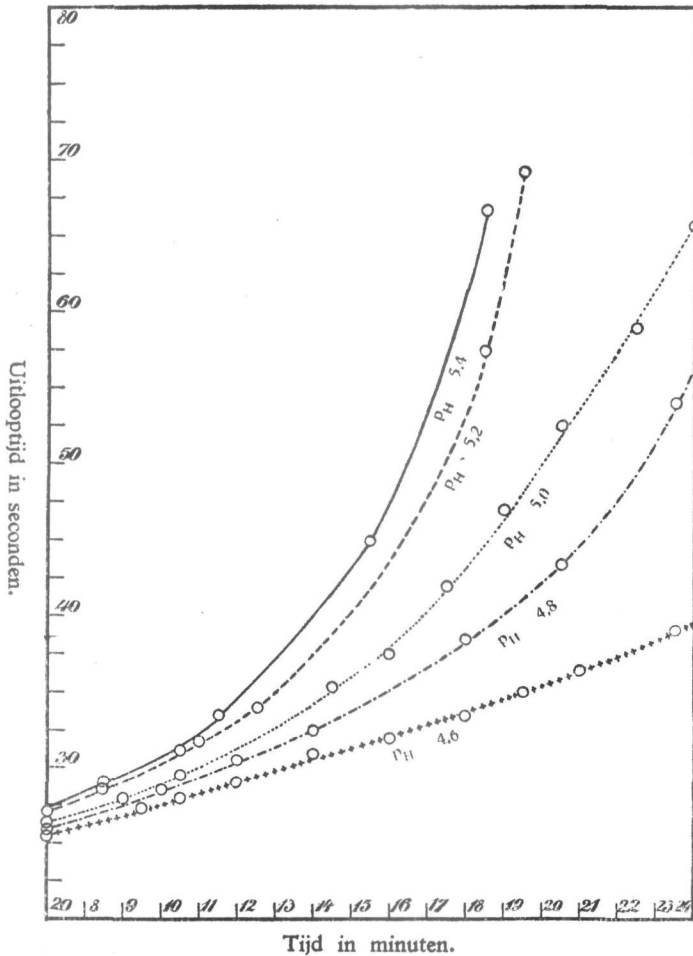


Fig. 7. *Afhankelijkheid der viscositeitsveranderingen van een oplossing van citroenpectine onder den invloed van klaverpectase van de waterstofionenconcentratie (bij 32° C.).*

bij afwezigheid van pectase geenerlei verandering in de viscositeit der pectineoplossing teweeg, terwijl voorts bleek, dat de verschillende waterstofionenconcentraties inderdaad gedurende het geheele verloop van het geleeringsproces constant bleven.

Een onderzoek van dit gebied leek ook daarom van belang, omdat zooals in Hoofdstuk VI reeds is opgemerkt, EULER en SVANBERG op zeer onvoldoende gronden besluiten, dat de optimale waterstofionenconcentratie voor de pectasewerking — waarbij zij eveneens de geleering als criterium gebruiken — bij een $\text{pH} = 4,3$ is gelegen.

Bij deze proefnemingen werden steeds 10 cc. buffermengsel vermengd met 5 cc. van een 2%-ige oplossing van citroenpectine A en 5 cc. van een klaverpectase-oplossing. Er werd weer 10 cc. in den viscosimeter gebracht, alle proefnemingen geschieden bij 32°C .

De verkregen uitkomsten zijn in Fig. 7 vereenigd.

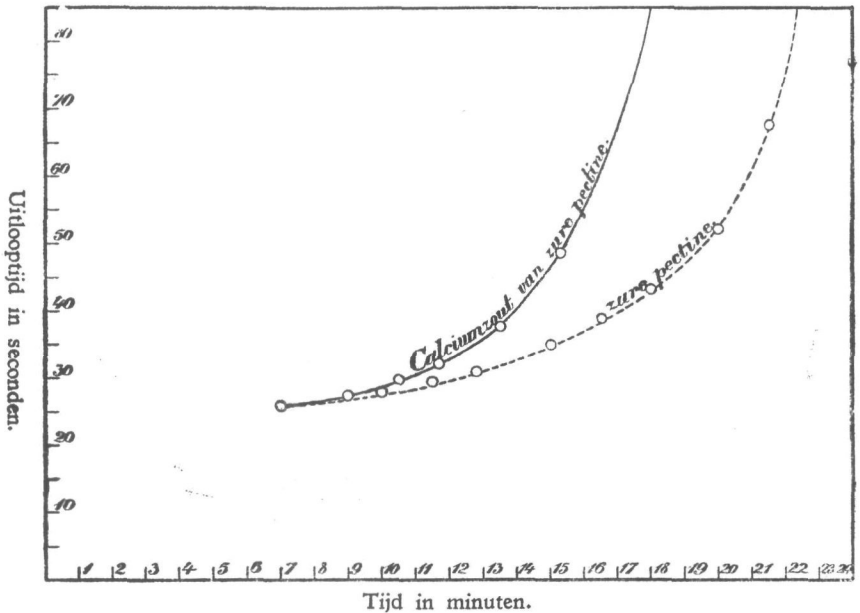


Fig. 8. Verloop van de viscositeitsveranderingen van oplossingen respectievelijk van zure pectine en van het calciumzout hiervan onder den invloed van neutrale klaverpectase bij 32°C .

Wij zien hieruit, dat in het beschouwde gebied de viscositeits-toeneming bij toenemende waterstofionenconcentratie zeer merkbaar langzamer verloopt. Dit blijkt ook zeer duidelijk uit een beschouwing van de tijden, waarna bij de verschillende pH's geleering intreedt:

pH = 4,6	geleeringstijd: 32,5 min.
pH = 4,8	„ : 27 „
pH = 5,0	„ : 24,5 „
pH = 5,2	„ : 22 „
pH = 5,4	„ : 18,5 „

Hoe onvolledig deze waarnemingen ook mogen zijn, toch spreken zij zeer ten gunste van de door de Fransche onderzoekers: BERTRAND en MALLÈVRE en ook KOPACZEWSKI uitgesproken meening, dat de pectase hare optimale werking ontvouwt in een omstreeks neutraal medium en sterk tegen het inzicht van EULER en SVANBERG, dat voor dit enzyme de optimale waterstofionenconcentratie bij een pH = 4,3 zou zijn gelegen.

In overeenstemming met deze zienswijze staat ook het feit, dat bij onderzoek van de geleeringssnelheid van zure pectine en van de daaruit bereide calcium- en ammoniumzouten, deze laatste een merkbare hoogere snelheid bleken te bezitten. Men vergelijkte hiervoor Fig. 8. Het feit, dat de krommen voor de beide genoemde zouten nagenoeg samenvallen, pleit er voor, dat het ook hier de waterstofionenconcentratie is, welke den doorslag geeft.

HOOFDSTUK VIII.

VROEGERE ONDERZOEKINGEN OVER PROTO- PECTINASE EN PECTINASE.

§ 1. Inleiding.

Na hetgeen in Hoofdstuk II over de localisatie der pectine-stoffen in het plantenweefsel is medegedeeld, kan het geen verwondering verwekken, dat die processen welke tot een verdwijnen der pectinestoffen uit het weefsel leiden, reeds lang de aandacht der onderzoekers hebben getrokken. Immers voor zoover deze processen de overige celwandbestanddeelen en meer in het bijzonder de cellulose ongerept lieten, moest een oplossen der voor alles in de tusschenlamellen gelocaliseerde pectinestoffen noodzakelijkerwijze een uiteenvallen van het celweefsel in de afzonderlijke cellen ten gevolge hebben.

Uiterst talrijk zijn dan ook de onderzoekingen, welke zich met dit desintegratieproces van plantaardige celweefsels eensdeels onder den invloed van parasitaire micro-organismen, anderdeels bij het mineralisatieproces der afgestorven weefsels, hebben bezig gehouden.

Een en ander leidde tot het gezichtspunt, dat er bepaalde micro-organismen waren aan te wijzen, die meer in het bijzonder het vermogen bezaten om pectinestoffen aan te tasten. Welhaast vanzelfsprekend bracht dit resultaat vele onderzoekers tot de — weliswaar in vele gevallen experimenteel geenszins gefundeerde — slotsom, dat de bewuste micro-organismen slechts over dit pectine-oplossend vermogen beschikten, doordat zij in het bezit waren van een speciaal agens van enzymatisch karakter, aan welk agens dan doorgaans de naam van pectinase of ook wel pectosinase werd gegeven. Hier-tegenover wordt intusschen door enkele onderzoekers het standpunt verdedigd, dat bij het doordringen van parasitaire schimmels in plantenweefsels en het daarmee gepaard gaande oplossen der pectinestoffen, niet enzymen maar bepaalde stofwisselingsproducten van den fungus, waarbij in het bijzonder de aandacht op oxalaten wordt gevestigd, van doorslaggevende beteekenis zijn.

Dit laatste neemt niet weg, dat het bestaan van pectinestoffen-oplossende enzymen in den loop der jaren buiten twijfel is gesteld. In de hieronder volgende paragraaf zal een overzicht worden gegeven van de onderzoekingen, welke hiervoor het bewijsmateriaal hebben geleverd en tevens worden medegedeeld, hetgeen over deze pectine-afbrekende enzymen bekend is geworden.

Alvorens hiertoe over te gaan, lijkt het intusschen gewenscht erop te wijzen, dat, na hetgeen omtrent de chemie der pectinestoffen en hare wijze van voorkomen in de plant bekend is geworden, ieder verdwijnen van pectinestoffen uit een plantenweefsel geenszins een ver doorgevoerde afbraak dier pectinestoffen behoeft in te houden. Uit hetgeen daarover in de beide eerste Hoofdstukken van dit proefschrift is medegedeeld, volgt toch met groote waarschijnlijkheid, dat de pectinestoffen althans grootendeels in den vorm eener onoplosbare protopectine in de plant voorkomen. Een eenvoudig losmaken der eigenlijke in water oplosbare pectine van het complex, waaraan deze in de protopectine is gebonden (cellulose, hemicellulosen, lignine, enz.) zal afdoende zijn om de pectine te doen verdwijnen en daarmee het verband der cellen onderling te verbreken. Een en ander maakt het noodzakelijk, scherp te onderscheiden tusschen het enzyme, dat uit de protopectine de pectine vrijmaakt en een eventueel de eigenlijke pectine, respectievelijk het pectinezuur, in de hydrolytische bouwsteen splitsend enzyme. Voor deze beide enzymen zijn respectievelijk de benamingen *protopectinase* en *pectinase* aangewezen. Door in het vervolg van deze benamingen gebruik te maken, ben ik in overeenstemming met de in 1926 te Philadelphia door een commissie van de American Chemical Society vastgestelde nomenclatuur voor de pectine-enzymen, welke Prof. J. J. WILLAMAN van de „University of Minnesota” zoo vriendelijk was, mij te verstrekken.

Het vóór korten tijd gepubliceerde onderzoek van DAVISON en WILLAMAN¹⁾ over de pectine-enzymen levert een krachtigen steun voor de opvatting, dat het gegrond is een scheiding tusschen de beide genoemde enzymatische principe's onderling en de in de beide vorige hoofdstukken behandelde pectase, aan te brengen. Genoemde onderzoekers wijzen er toch op, dat de drie genoemde enzymen nimmer gezamenlijk in hetzelfde plantaardige materiaal

¹⁾ F. R. DAVISON and J. J. WILLAMAN. Bot. Gaz. 83, pag. 329, (1927).

worden aangetroffen, dat verder de temperatuur van inactivering voor de drie enzymen merkbaar verschillend is, evenals ook de optimale waterstofionenconcentratie. Verder konden bij materialen, die twee dergelijke enzymen bevatten, weliswaar niet volledige scheidingsmethoden worden toegepast.

Terwijl de afgrenzing der pectase van de beide andere enzymen relatief eenvoudig is, zooals uit het in de vorige Hoofdstukken medegedeelde wel afdoende blijkt, was de voorafgaande beschouwing voor mij aanleiding, de uitkomsten der vroegere onderzoekingen gescheiden te bespreken, al naar gelang zij enkel betrekking hebben op het verdwijnen der natuurlijk voorkomende pectinestoffen uit het plantenweefsel, dan wel dat zij handelen over de splitsing van pectine of pectinezuur in hunne bouwsteen. De eerstgenoemde onderzoekingen zullen dus onder het hoofd *protopectinase* worden samengevat, ofschoon deze benaming in de oudere literatuur nimmer wordt aangetroffen. De laatstbedoelde onderzoekingen volgen dan in § 3 onder het hoofd *pectinase*.

§ 2. De protopectinase.

a. Onderzoekingen over de productie van protopectinase door micro-organismen.

De onderzoekingen over de productie van protopectinase door micro-organismen kunnen in twee groepen worden ondergebracht en wel laten zich eenerzijds onderscheiden die onderzoekingen, welke zich met het verdwijnen der pectinestoffen in afgestorven plantenweefsels bezighouden, terwijl daarnaast de onderzoekingen zijn te noemen, welke verband houden met de aantasting van levende plantenweefsels door parasitaire organismen. Achtereenvolgens zal ik van beide onderzoekingsgroepen hier een kort overzicht geven.

De eerste onderzoeker, die het uiteenvallen van afstervende jonge plantaardige weefsels onder den invloed van micro-organismen meer nauwkeurig bestudeerde was VAN TIEGHEM ¹⁾ in 1879. Deze kwam tot de conclusie, dat daarbij vooral verschillende vormen van *Bacillus amylobacter* werkzaam zouden zijn. Oudere lignine- en suberinehoudende weefsels, evenals gecuticulariseerde weefsels en de cellulose van bastvezels bleken door deze organismen niet te

¹⁾ PH. VAN TIEGHEM, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 88, pag. 205, (1879).

worden aangetast. Reeds vroeger in 1868 had KOLB ¹⁾ de veronderstelling gemaakt, dat de vlasrotting op eene pectinefermentatie berustte, hetgeen later door WINOGRADSKY ²⁾ en FRIBES werd bevestigd, die uit eene anaërobe vlasrotting eene plectridiumvormig micro-organisme isoleerden, dat volgens hen alleen de uit pectinstoffen bestaande tusschenlamellen oploste en de cellulose onaangetast liet. Ook BEHRENS vond bij rottingen op verschillende manieren, dat deze berustten op de oplossing van de tusschenlamellen van het parenchymatisch weefsel, hetgeen veroorzaakt werd door een specifieke anaërobe *Bacillus* of in andere gevallen door fungi. De latere onderzoekingen betreffende vlasrottingen wijzen vrijwel alle uit, dat eene goede vlasrotting alleen kan worden bereikt met een micro-organisme, dat van de celwandbestanddeelen enkel de pectinstoffen aantast.

BEIJERINCK en VAN DELDEN ³⁾ verkregen reeds sterke aanwijzingen, dat de vlasrotting werd veroorzaakt door een door *Granulobacter pectinovorum* afgescheiden, pectine-oplossend enzyme, waaraan zij den naam *pectosinase* gaven. Zij wijzen in dit verband op het feit, dat een reincultuur der door hen geïsoleerde bacterie een weliswaar zwak versmeltende werking uitoefent op een met pectase uit gentiaanpectine bereid pectinezuurgel. In het licht der latere onderzoekingen over de chemie der pectinstoffen mag deze waarneming evenwel niet als bewijzend voor het aanwezig zijn eener protopectinase worden opgevat. Toch is ongetwijfeld de protopectinase het voor de rotting gewichtigste agens.

In latere jaren is door RUSCHMANN en BAVENDAMM ⁴⁾ nog een uitvoerig onderzoek verricht over den het eerst door CARBONE beschreven *Bac. felsineus*. De genoemde onderzoekers concludeeren voor dit organisme tot de aanwezigheid van een krachtig vermogen tot „pectinase“-afscheiding, welk vermogen dat van *Bac. amylobacter* sterk overtrof.

Van de onderzoekers, die een studie hebben gemaakt van de aantasting van levende plantenweefsels door parasitaire micro-organismen, is in de eerste plaats DE BARY ⁵⁾ te noemen. Het gelukte

¹⁾ J. KOLB, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 66, pag. 1024, (1868).

²⁾ S. WINOGRADSKY, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 121, pag. 742, (1895).

³⁾ Zie: M. W. BEIJERINCK, Verzamelde Werken, Deel IV, pag. 212.

⁴⁾ G. RUSCHMANN und W. BAVENDAMM, Centralbl. f. Bakt. II, 64, pag. 340, (1925); Ibid. II, 65, pag. 43, (1925).

⁵⁾ A. DE BARY, Bot. Zeit. 44, pag. 377, 393, 409, 433, 449, 465, (1886).

dezen uit een reïncultuur van zijn *Peziza sclerotiorum* (*Sclerotinia Libertiana*, Fuckel) op wortelen een „cytolytisch” enzyme af te scheiden. Dit enzyme bewerkte eerst eene opzwellung van de celwanden, welke opzwellung gevolgd werd door eene volledige oplossing van de tusschenlamel en bijgevolg eene isoleering van de cellen. Hetgeen er van de celwanden was overgebleven, vertoonde eene fraaie cellulose-actie met chloor-zink-jood. Het enzyme doordringt volgens DE BARY de gastheer-cellen nog vóór de fungus ze bereikt heeft en doodt het protoplasma.

Uit het voorafgaande blijkt, dat DE BARY aan zijn „enzyme” zeer uiteenlopende werkingen toeschrijft, behalve het oplossen der tusschenlamellen — protopectinase-werking — zou er vóór alles een vergiftige werking op het protoplasma van uit gaan. Van belang is, dat DE BARY uitdrukkelijk opmerkt, dat in ieder geval het de celwanden aantastende principe een zuiver enzymatisch karakter bezit; wat de giftige werking aangaat, acht hij het waarschijnlijk, dat daarnaast ook niet-enzymatische stoffen medewerken, waarbij hij onder meer wijst op de doorgaans in rijkelijke hoeveelheden door den fungus afgescheiden oxalaten.

MARSHALL WARD¹⁾ publiceert twee jaar na DE BARY een uitgebreid onderzoek over de aantasting van den leliebol door verschillende *Botrytis*-soorten. De hyphen van deze schimmels bleken volgens hem, wanneer ze in aanraking kwamen met een vast voorwerp, zoo bijvoorbeeld met den bol van een lelie of met een dekglasje, aan den top een druppeltje van eene vloeistof af te scheiden. Deze druppeltjes werden door WARD geïsoleerd en op stukjes van een leliebol gebracht. Ze gaven, evenals het enzym van DE BARY eene opzwellung van de celwanden, de tusschenlamel werd daarna opgelost en tenslotte viel het geheele weefsel uit elkaar. Na verwarmen waren de druppeltjes eveneens onwerkzaam, zoodat ook hier tot de aanwezigheid van een protopectinase in dit schimmelexcreet mag worden besloten. Ook het cellulosemembraan werd tenslotte door het enzyme aangetast, hetgeen dus op de aanwezigheid van eene cytase wees.

ARTHUR²⁾ heeft soortgelijke enzymafscheidings op de jonge hyphen van een *Rhizopus*-soort waargenomen en concludeert tot het daarin voorkomen van een „cytohydrolytisch” enzyme.

¹⁾ H. MARSHALL WARD, Ann. Bot. 2, pag. 319, (1888).

²⁾ J. C. ARTHUR, Ann. Bot. 11, pag. 491, (1897).

Intusschen zijn niet alle onderzoekers van meening, dat een enzyme steeds de oorzaak is van de aantasting van de pectinestoffen in de planten. WEHMER¹⁾ bestudeerde de bacteriën, welke betrekking hadden op het rotten van aardappelen, waarbij hij onderscheid maakte tusschen de z.g.n. „Breifäule” en de „Schleimfäule”. De „Breifäule” was enkel eene oplossing van de tusschenlamel, hetgeen volgens hem veroorzaakt werd door een zuur, dat door de bacteriën werd afgescheiden, en *niet* door een enzyme. Bij de „Schleimfäule” had eene volledige oplossing van den geheelen celwand plaats, dus ook van de cellulose.

BEHRENS²⁾ toonde bij *Penicillium glaucum* en *P. luteum* naast het enzyme ook een vergift aan (toxine), hetgeen dus in overeenstemming is met DE BARY'S waarneming. Het enzyme was in staat de tusschenlamel op te lossen, terwijl het toxine, dat overbleef, nadat het enzyme door koking was gedood, in staat was de cellen te doodden.

Hiertegenover vestigt SMITH³⁾ nadrukkelijk de aandacht op de afscheiding van oxaalzuur door *Botrytis cinerea* Bon. Hij neemt voorts waar, dat het gekookte schimmelextract evenzeer nog de eigenschap bezit om het weefsel te doodden en uit elkaar te doen vallen, terwijl hij eenzelfde effect ook met verdunde oxaalzuuroplossingen weet te bewerken. Voor het geval, dat *Botrytis* een weefsel aantast, zal dus volgens SMITH het weefsel eerst worden gedood en gemacereerd door het door den fungus afgescheiden oxaalzuur, waarna de fungus door middel van enzymen de verschillende bestanddeelen van het weefsel zal verbruiken. Uitdrukkelijk zij opgemerkt, dat hij de werking van *Botrytis cinerea* als identiek met de door DE BARY bestudeerde werking van *Sclerotinia Libertiana* beschouwt.

Een zeer uitvoerige studie maakte JONES⁴⁾ van de door zijn *Bac. carotovorus* bewerkte z.g. „soft-rot”. Ook hierbij wordt volgens JONES een enzyme *pectinase* afgescheiden, dat de tusschenlamellen oplost. Hij scheidde het enzyme op verschillende manieren uit zijne cultures af o. a. door alcoholpraecipitatie en door verhitting. De meest gunstige omstandigheden voor een alcoholpraecipitatie

¹⁾ C. WEHMER, Centralbl. Bakt. II, 4, pag. 540, 570, 627, 694, 734, 795, (1898).

²⁾ J. BEHRENS, Centralbl. Bakt. II, 4, pag. 514, 547, 577, 635, 700, 739, 770, (1898).

³⁾ R. E. SMITH, Bot. Gaz. 29, pag. 369, (1900); Ibid. 33, pag. 421, (1902).

⁴⁾ L. R. JONES, Centralbl. Bakt. II, 7, pag. 12, 61, (1901); Ibid. 14, pag. 257, (1905); Technical Bull. No. 11, Nov. 1909, of the New York Agr. Exp. Stat. Part III.

van het enzyme bleken te zijn bij eene alcoholconcentratie van 80%. Het enzyme bleek bij deze bewerking nagenoeg niet in activiteit achteruit te gaan. De bereiding van het enzyme door verhitting berustte op een dooden van de bacteriën bij verhitting gedurende 10 minuten op eene zoodanige temperatuur, dat het enzyme nog zijne werking behield. De meest geschikte temperatuur voor een aldus te bereiden enzymvloeistof bleek te liggen bij ongeveer 51 à 58° C. Eene totale inactivering van het enzyme had plaats bij eene verhitting gedurende 10 minuten op eene temperatuur van 63° C. Iedere verhitting evenwel, zelfs tot 54° C., bleek het enzyme minder actief te maken. Bij 51° C. lag volgens JONES de temperatuursgrens, waarbij de bacteriën door eene verhitting gedurende tien minuten nog juist geheel werden gedood.

Eene afscheiding van eene enzymvloeistof door middel van het toevoegen van antiseptica, zooals chloroform, bleek eveneens zeer goed te voldoen, mits een groote overmaat chloroform werd toegevoegd (ongeveer 10%), terwijl deze methode het voordeel had, dat het enzyme in het geheel geen schadelijken invloed van de chloroform ondervond. Een mengsel van water met 10% chloroform bleek zelf geen oplossende werking te vertoonen op de tusschenlamel. De naam pectinase heeft JONES voor zijn enzyme gekozen naar aanleiding van het onderzoek van BOURQUELOT en HÉRISSEY (zie pag. 131), die dezen naam gaven aan het in moutextract aanwezige enzyme, dat in staat was, de pectine te hydrolyseeren, terwijl dit extract eveneens het door pectase gevormde pectinezuur kon hydrolyseeren. JONES vermoedde nu, dat dit één en hetzelfde enzyme was, en tevens dat het enzyme van *Bac. carotovorus*, daar het in staat was *pectose* (= protopectine, welke hij dus verwart met de pectine van BOURQUELOT en HÉRISSEY), op te lossen, ook wel in staat zou zijn, om pectinezuur te hydrolyseeren. Dit is dus slechts een vermoeden van JONES, dat op zeer losse gronden berust.

Van de latere onderzoekingen over de protopectinase behooren die van BROWN¹⁾ wel tot de belangrijkste. Hij maakt zeer krachtig werkende enzympraeparaten van *Botrytis cinerea*. In eene later verschenen publicatie noemt hij het door hem bestudeerde in deze praeparaten aanwezige enzyme *cytase*. Hij besluit uit zijne proeven, dat het enzyme, dat door *Botrytis cinerea* wordt afgescheiden, zoowel

¹⁾ W. BROWN, Ann. of Bot. 29, pag. 313, (1915); Ibid. 31, pag. 489, (1917).

eene vergiftige, dus doodende werking op het protoplasma van het gastheerweefsel heeft, als eene oplossing van de celwanden veroorzaakt, zoodat het weefsel uit elkaar valt. Deze twee eigenschappen van het enzyme zouden steeds samen gaan. In tegenstelling met de opvatting van SMITH spelen oxaalzuur evenals oxalaten volgens BROWN geen rol bij de doodende werking van het extract. Het eerste, wat hij waarneemt bij de inwerking van zijn enzymextract is de oplossing van de tusschenlamel, zoodat het weefsel uiteenvalt. In dit stadium zijn in de meeste gevallen de cellen zelf nog levend en plasmolyseeren nog. Spoedig daarna lost ook een groot gedeelte van den verderen celwand op en valt uiteen in „lamellen”.

Het afsterven van de cellen treedt spoedig na het uiteenvallen van de celwanden in. Aanvankelijk spreekt hij positief uit, dat volledige oplossing van den celwand in geen enkel geval plaats heeft, doch later vermeldt hijzelf eenige uitzonderingen op dezen regel (pag. 330, 1ste verh.).

Het enzymextract kan geïnactiveerd worden door verhitting, door neutralisatie met alkali of door eene mechanische beweging. Ook de afsterving veroorzakende werking van het extract wordt hierdoor weggenomen. Uit de onderzoekingen van BROWN moeten we besluiten, dat hier naast een protopectinase ook eene cellulose of hemicellulose oplossend enzyme aanwezig is, daar anders niet het geheele weefsel in oplossing zou kunnen gaan.

Ook DIANA BRUSCHI¹⁾ kon uit *Fusarium niveum* Atk. en *Monilia cinerea* een enzyme afscheiden, dat de pectinetusschenlamellen oplost, maar niet de cellulose aantast. Voor *Fusarium lycopersici* was het twijfelachtig, of ze al of niet „pectinase” bevatte.

Eene uitvoerige studie werd verder enkele jaren geleden door WEIMER en HARTER²⁾ over de „pectinase”-productie van verschillende *Rhizopus*-soorten verricht. Zij kwamen tot de conclusie, dat het enzyme bij iedere temperatuur werd geproduceerd, waarbij de fungus wilde groeien. De hoeveelheid van het geproduceerde enzyme nam echter af bij de verhooging van de temperatuur, waarbij het

¹⁾ DIANA BRUSCHI, Atti della Reale Accademia dei Lincei. Ser. V. Rendiconti Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali 21. Sem. I pag. 225, pag. 298, (1912).

²⁾ L. L. HARTER and J. L. WEIMER, Journ. of Agr. Res. 21, pag. 609, (1921); Ibid. 22, pag. 371, (1921); Ibid. 10, pag. 167, (1923).

J. L. WEIMER and L.L. HARTER, Am. Journ. of Bot. 10, pag. 127, (1923); Journ. of Agr. Research, 24, (1923).

mycelium was gegroeid. De niet-parasitaire variëteiten (*R. chinensis* en *R. microsporus*) produceerden meer enzyme dan de parasieten (zooals *R. nigricans*), welke laatste fungus slechts zeer weinig enzyme voortbracht.

De tusschenlamellen van het weefsel van oude bataten bleken in de helft van den tijd op te lossen, waarin die van versch opgegraven bataten oplosten. Ook sporen, zoowel gekiemd als ongekiemd, bleken reeds eene aanzienlijke hoeveelheid enzyme te bevatten, waaruit H. en W. besloten, dat de „pectinase” een belangrijke rol speelde in de initiale voeding van den fungus en dat ze een belangrijke factor zou zijn bij de infectie van sommige gastheerweefsels. De bataten moeten evenwel dood of gewond zijn, wil *Rhizopus nigricans* ze kunnen infecteeren. Het enzyme wordt volgens W. en H. door deze schimmel geproduceerd op alle plantaardige voedingsmedia, niet echter op synthetische media met glucose als koolstofvoedsel. Pectine alleen als koolstofbron gaf eene sterke „pectinase”-productie; pectine, gecombineerd met glucose evenwel eene zeer geringe productie. Volgens W. en H. beïnvloedt de pH de productie dezer „pectinase” niet. WEIMER en HARTER trekken uit hun onderzoekingen voorts de conclusie, dat de meerdere pathogene eigenschappen van een fungus niet altijd kunnen worden toegeschreven aan eene meerdere productie van het enzyme protopectinase, daar bij de *Rhizopus*-soorten juist het omgekeerde het geval is.

In dit verband wijst WILLAMAN ¹⁾ ook op *Sclerotinia cinerea*, die de rotting van vruchten, in het bijzonder van pruimen en perziken veroorzaakt. Reeds in 1914 had COOLEY ²⁾ onderzoekingen verricht over de aanwezigheid van een pectine aantastend enzyme in een extract van deze schimmelsoort, doch met negatief resultaat. COOLEY vestigt evenwel de aandacht op een vrij belangrijke productie van oxaalzuur bij groei van de schimmel op vruchtensappen, waarbij hij het intusschen twijfelachtig vindt of dit zuur de tusschenlamellen van het aangevallen weefsel tot oplossing kan brengen. Op grond van de waarneming van VALLEAU ³⁾, dat de hyphen van *Sclerotinia cinerea* bij de invasie van het vruchtweefsel de daarin aanwezige tusschenlamellen volgt, voorspelde WILLAMAN ⁴⁾ in 1920 de aan-

¹⁾ J. J. WILLAMAN, Minnesota Studies in Biological Sciences 6, pag. 333, (1927).

²⁾ J. S. COOLEY, Ann. of the Missouri Bot. Garden 1, pag. 291, (1914).

³⁾ W. D. VALLEAU, Journ. Agr. Res. 5, pag. 365, (1915).

⁴⁾ J. J. WILLAMAN, Bot. Gaz. 70, pag. 221, (1920).

wezigheid eener protopectinase in de bewuste schimmelsoort. Vrij spoedig hierop werd door MUHLEMAN ¹⁾ experimenteele evidentie ten gunste van deze opvatting gepubliceerd. Hiertegenover is het in hooge mate opmerkelijk, dat DAVISON en WILLAMAN, die naar deze kwestie een uiterst zorgvuldig onderzoek instelden, blijkens hun reeds eerder geciteerde publicatie in *Sclerotinia cinerea* niet de minste protopectinase konden vaststellen. Reeds dadelijk moge worden opgemerkt, dat ook ik — men zie hiervoor de in Hoofdstuk IX § 4 beschreven proefnemingen — reeds vóór het verschijnen der genoemde publicatie tot een zelfde resultaat was gekomen.

De laatstgenoemde publicatie van DAVISON en WILLAMAN bevat ook verder tal van belangwekkende gegevens over de protopectinase. Zij onderzochten verschillende materialen op de aanwezigheid van protopectinase, waarbij strookjes aardappelweefsel als substraat dienst deden. Op deze strookjes lieten zij de extracten van de te onderzoeken materialen inwerken. Het resultaat was, dat alleen *Rhizopus Tritici* en *Bac. carotovorus* een krachtige protopectinase bleken te produceeren. Behalve *Sclerotinia cinerea* bleken ook *Aspergillus niger*, verschillende enzympraeparaten van uiteenloopende herkomst, evenals klaverbladeren en mout, geenerlei protopectinase te bevatten, alleen takadiastase en emulsine vertoonden een zwakke werking. Verdere onderzoekingen hadden betrekking op de optimale voorwaarden voor de productie en de activiteit van de protopectinase van *Rhizopus Tritici*, deze onderzoekingen zullen evenwel in aansluiting op mijn eigen waarnemingen in het volgende hoofdstuk worden besproken. Vermelding dient nog slechts, dat DAVISON en WILLAMAN eveneens nog eens het vraagstuk van de macereerende werking van oxalaten aan een onderzoek onderwierpen. Zij lieten ammonium-, kalium- en natriumoxalaat bij verschillende pH inwerken op weefsels van aardappel, appel, citroen en wortel, doch konden in geen enkel geval een positief effect waarnemen.

b. De onderzoekingen over het optreden van protopectinase in hogere planten.

In hoofdstuk II is reeds melding gemaakt van de zeer in het oog vallende omzettingen, welke pectinestoffen bij het rijp en overrijp worden van vruchten ondergaan. Dat bij deze pectinemetamorphose,

¹⁾ G. W. MUHLEMAN, Bot. Gaz. 80, pag. 325, (1925).

zoals TSCHIRCH dit verschijnsel genoemd heeft, door de plantaardige cellen zelf afgescheiden enzymen werkzaam zullen zijn, ligt zeer voor de hand. Toch ontbreken op dit punt experimenteele bewijzen, welke zeer gewenscht zijn, aangezien het denkbaar is, dat ook de in de vruchten aanwezige zuren in bedoeld opzicht werkzaam kunnen zijn. Om deze reden heb ik hierover eenige waarnemingen verricht bij het zoogenaamde „rot” worden van den mispel, waarop in het volgende Hoofdstuk zal worden ingegaan.

Een belangwekkend voorbeeld van het afscheiden van protopectinase door cellen van hogere planten leveren de uitvoerige onderzoekingen van JULIA PATON ¹⁾ over de protopectine-aantasting door pollenkorrels van verschillende plantensoorten. Zij beschrijft hierbij, hoe de pollenbuizen bij het doordringen van het stijlweefsel — althans voor zoover de stijl niet van nature hol is — zich een weg tusschen de celwanden van dit weefsel banen. GREEN ²⁾ had reeds vroeger de veronderstelling gemaakt, dat er een cytolytisch enzyme in de pollen aanwezig moest zijn, dat behulpzaam was bij de doorboring van den stijl door de pollenbuizen. Hij heeft dit enzyme evenwel niet kunnen aantonen, maar concludeert toch, dat het aanwezig moet zijn en beschouwt het als identiek met het *Botrytis*-enzyme van WARD, dat in staat was, de tusschenlamel op te lossen.

PATON bewijst met hare proeven, dat hier eene *protopectinase* (zij noemt het pectinase) aanwezig is, die de tusschenlamellen voor de pollenbuis uit oplost. In de 18 verschillende soorten van pollen, die zij heeft onderzocht, was overal naast eenige andere enzymen „pectinase” aanwezig. Cytase werd slechts twijfelachtig waargenomen in zes van de achttien gevallen.

Voorts bestaat de mogelijkheid, dat het afvallen van de bladeren geheel of ten deele veroorzaakt wordt door protopectinase, die de scheidingslaag, welke zich eenigen tijd voordat een blad gaat afvallen aan den voet van den bladsteel vormt, in oplossing doet gaan. Eene zeer uitvoerige beschrijving over het vallen der bladeren van *Coleus Blumei* is gegeven door H. C. SAMPSON ³⁾, die het afvallen der bladeren van deze plant beschouwt als veroorzaakt te worden door eene omzetting van cellulose in „pectose”, welke verder in pectine en pectinezuur wordt omgezet, hetgeen dan ter plaatse tot een

¹⁾ JULIA BAYLES PATON, American Journ. of Bot. 8, pag. 471, (1921).

²⁾ J. R. GREEN, Phil. Trans. Roy. Soc. London B 185, pag. 385, (1894).

³⁾ H. C. SAMPSON, Bot. Gaz. 66, pag. 32, (1918).

overmaat aan pectinezuur leidt, zoodat er geen calcium genoeg aanwezig is, om de pectinestoffen der tusschenlamellen in de scheidingslaag in een vasten vorm te doen blijven.

SAMPSON beschouwt het als eene open vraag, of hierbij ook enzymen in het spel zijn. Onze kennis der pectinestoffen in aanmerking genomen, is bovengenoemde beschouwing wel heel moeilijk te aanvaarden. De vorming van pectose uit cellulose nog daar gelaten, ligt het toch veel meer voor de hand, om de overgang van „pectose” in pectine (oplosbaar, calciumzout eveneens oplosbaar) te beschouwen als het proces, waardoor het blad zal loslaten. Zelfs wanneer, zooals SAMPSON beweert, er pectinezuur aanwezig zou zijn in de tusschenlamel, zou dit nog niet oorzaak behoeven te zijn van het afvallen der bladeren, daar pectinezuur zeer weinig oplosbaar is. Meer waarschijnlijk lijkt het, dat het afvallen der bladeren veroorzaakt wordt door een overgang van protopectine in oplosbare pectine, daar ter plaatse, waarbij dan mogelijk protopectinase in het spel zal zijn.

Ongetwijfeld zullen er verder nog tal van andere verschijnselen in de natuur aan het oplossen van protopectine door protopectinase moeten worden toegeschreven, zoodat de beteekenis van dit enzyme in de toekomst ongetwijfeld nog zal toenemen.

§ 3. De pectinase.

Over het enzyme, dat op grond der in § 1 gegeven definitie werkelijk aanspraak mag maken op den naam pectinase, is nog maar weinig bekend. Zooals reeds eerder werd opgemerkt, zal in vele gevallen het afbreken der pectinestoffen geschieden door meerdere pectine-enzymen. Zoo zullen de pectinestoffen in vruchten, b.v. peren, waarschijnlijk dikwijls de heele metamorphose doormaken van af de protopectine in de onrijpe peer tot aan de reduceerende suikers en het galacturonzuur(?) in de overrijpe peer. Hier zal dus in vele gevallen ook de pectinase aanwezig zijn.

BOURQUELOT en HÉRISSEY¹⁾ waren de eerste onderzoekers, die pectinase werkelijk wisten aan te toonen, en wel in gekiemde gerst. De gekiemde gerst werd hiertoe bij een temperatuur tusschen

¹⁾ E. BOURQUELOT, Journ. Pharm. et Chim. 16, pag. 581, (1902); Ibid. 9, pag. 563, (1899).

E. BOURQUELOT et H. HÉRISSEY, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 127, pag. 191, (1898).

30 en 35° C. gedroogd, daarna gemalen in een molen, dan in chloroformwater gedurende 12 uren uitgetrokken en uitgeperst. Daarna lieten zij de vloeistof bezinken, filtreerden weer en sloegen het filtraat met alcohol neer, waarna het zoo verkregen neerslag met alcohol, daarna met aether werd gewasschen en in vacuum gedroogd.

Het zoo bereide *pectinase*-praeparaat was in staat, om zoowel het met pectase uit pectine bereide pectinezuur, als wel de pectine zelf, tot FEHLING's oplossing reduceerende stoffen te splitsen. Bij aanwezigheid van calciumcarbonaat werkte het enzyme het beste, d. w. z. dan werden uit eene bepaalde hoeveelheid pectine de meeste reduceerende suikers gevormd. Indien de *pectinase* eenmaal op de pectine had ingewerkt, dan was de pectase niet meer in staat, ze te coaguleeren, terwijl een coagulum, gevormd door pectine en pectase weer vervloede, wanneer *pectinase* werd toegevoegd. De genoemde onderzoekers bepaalden steeds de reductie in de vloeistof, die verkregen werd door na de enzymwerking overmaat alcohol toe te voegen, af te filtreeren en daarna in te dampen, tot de alcohol er uit was verdwenen. Zij hebben dus waarschijnlijk de reductie bepaald van het galacturonzuur plus de suikers, die hieraan in het pectinemolecule gekoppeld zijn geweest.

Of de boven beschreven omzettingen nu inderdaad in haar geheel aan *pectinase* moeten worden toegeschreven, valt te betwijfelen, daar er, zooals uit mijne proeven zal blijken, ook pectase in het gerstextract kan voorkomen. De *pectinase* zal dan onder deze voorwaarden waarschijnlijk slechts het werk van de pectase voortzetten, doordat het laatste enzyme eerst de pectine tot pectinezuur hydrolyseert, waarna de *pectinase* dit zuur in zijn bouwsteen zal splitsen.

Voorts is er dan nog melding van te maken, dat BEIJERINCK en VAN DELDEN (l. c.) in hun streven om in de door hen geïsoleerde *Granulobacter pectinovorum* een de pectinestoffen der tussenlamel aantastend enzyme aan te toonen, het verkregen enzympraeparaat ook op een met pectase bereid pectinezuurgel laat inwerken. De door hen geconstateerde zwakke versmelting van het gel wordt door hen, in het huidig licht bezien, dus ten onrechte, als een bewijs voor tussenlamelaantastend vermogen beschouwd. Heden ten dage mogen wij deze proefneming evenwel als het bewijs van het voorkomen eener ware *pectinase* in genoemde bacteriënsoort beschouwen. Dat dit feit niet altijd een protopectineaantastend ver-

mogen meebrengt, volgt uit de waarnemingen van DAVISON en WILLAMAN.

Voor het overige is nog slechts iets mede te deelen aangaande de reeds meermalen genoemde publicatie van laatstgenoemde onderzoekers. Deze constateerden onder meer, dat zoowel uit *Rhizopus Tritici* als uit *Sclerotinia cinerea* als uit *Botrytis cinerea* langs eenvoudigen weg een enzyme kon worden afgescheiden, dat zuivere pectine onder vorming van FEHLING's oplossing reduceerende stoffen hydroliseerde. Opmerkelijk is vooral het reeds hierboven genoemde feit, dat *Sclerotinia cinerea*, waarin ondanks talrijke aangewende pogingen, geen protopectinase was aan te toonen, een bijzonder krachtige pectinasewerking bleek te hebben. Eindelijk valt nog de vermelden, dat met behulp van gefractioneerde alcoholische praecipitatie van het enzymatisch extract van *Rhizopus Tritici* een vrij volledige scheiding tusschen protopectinase- en pectinaseactiviteit kon worden tot stand gebracht.

HOOFDSTUK IX.

EIGEN ONDERZOEKINGEN OVER HET VOORKOMEN EN DE BETEKENIS VAN PROTOPECTINASE EN PECTINASE.

§ 1. Doel der proefnemingen.

Zoals uit het in het vorige Hoofdstuk gegeven overzicht blijkt, is onze kennis der protopectinase en der pectinase nog vrij beperkt. In het bijzonder was deze opmerking van kracht in den tijd, gedurende welken ik mijne eigen waarnemingen verrichtte, te weten vóór het verschijnen van de in het vorige Hoofdstuk meermalen genoemde publicatie van DAVISON en WILLAMAN.

Wat de protopectinase betreft mocht worden vastgesteld, dat deze voor zoover zij van bacterieele herkomst is, uitsluitend door JONES uit *Bacillus carotovorus* was afgescheiden en tot op zekere hoogte bestudeerd. Er bestond dus alle aanleiding om een dergelijke isolatie eener bacteriënprotopectinase eens met een andere bacteriënsoort te herhalen en de voorwaarden der werkzaamheid van dit enzyme nader te onderzoeken.

Hiertegenover moet worden opgemerkt, dat de aanwezigheid eener protopectinase in verschillende schimmelsoorten door tal van onderzoekers buiten twijfel was gesteld. Evenwel heerschte er allerminst eenstemmigheid tusschen de verschillende onderzoekers aangaande de vraag, in hoeverre de protopectinase van doorslaggevende beteekenis is voor het vermogen dier schimmels om zich een weg te banen in de levende weefsels van hogere planten. Eenerzijds toch zijn er onderzoekers, die geneigd zijn aan het voorkomen van protopectinase in parasitaire fungi groote beteekenis toe te kennen voor genoemd proces. Hiertegenover staan dan onderzoekers, die er op wijzen, dat er ook bij naverwante soorten van éénzelfde schimmelgeslacht geenerlei paralleliteit bestaat tusschen het voorkomen van protopectinase en pathogene eigenschappen. Daarbij komt dan nog, dat er allerminst eensluidendheid bestaat in de meeningen van verschillende onderzoekers ten opzichte van

de vraag in hoeverre bepaalde stofwisselingsproducten der fungi en meer in het bijzonder oxalaten reeds voldoende zijn, om protopectine tot oplossing te brengen en dus aanleiding te geven tot het verbreken van het celverband in de aangevallen plantenweefsels. Ook in dit opzicht scheen nader onderzoek alleszins aangewezen.

Verder mocht het opmerkelijk heeten, dat tot dusver het voorkomen van protopectinase in hogere planten, behalve dan door PATON in pollenbuizen, nimmer was aangetoond. Het onderzoek van DAVISON en WILLAMAN brengt in dit opzicht ook slechts negatieve resultaten behoudens dan het enkele feit dat een emulsiepraeparaat van niet nader aangeduide herkomst een zwakke protopectinasewerking bleek te bezitten. Op aanraden van Prof. VAN ITERSON vestigde ik in verband hiermede mijn aandacht op den mispel, waarvan de vrucht bij het zoogenaamde „rot” worden eigenaardige veranderingen vertoont, welke een typische pectine-stofwisseling doen vermoeden.

Wat eindelijk de pectinase aangaat, moest worden geconstateerd, dat dit enzyme tot dusver alleen in gekiemde gerst met zekerheid was aangetoond. Betrouwbare opgaven omtrent het voorkomen van pectinase in schimmels ontbraken geheel. Toch scheen het niet zonder beteekenis, uit te maken of schimmelsoorten, die weefsels van hogere planten aantasten, de protopectine uitsluitend doen verdwijnen door afsplitsing der eigenlijke pectine, dan wel dat zij deze laatste stof hydrolyseeren en de daarbij gevormde producten dan ook als voedingssubstraat gebruiken. Sedert ik mijn positieve uitkomsten aangaande dit laatste punt verkreeg, is door DAVISON en WILLAMAN een overeenkomstig resultaat gepubliceerd.

Hiernaast leek ook een nader onderzoek naar de aanwezigheid eener eigenlijke pectinase in bacteriëenzympraeparaten niet overbodig.

§ 2. De gebruikte methodiek voor het aantoonen van protopectinase.

Gezien het feit, dat de protopectine niet met zekerheid in onveranderden toestand uit het plantenweefsel is af te scheiden, is het uiteraard aangewezen de al of niet aanwezigheid eener protopectinase in een of ander extract te toetsen, door dit extract in aanraking te brengen met een plantenweefsel, waarin de protopectine

een essentieel element vormt. Men kan dan, zooals de meeste onderzoekers gedaan hebben, het resultaat der proefneming beoordeelen naar het al of niet intreden eener verandering der mechanische eigenschappen van het weefsel. Toch is deze methode niet zonder gevaren, aangezien een in het oog vallende verandering slechts dan zal intreden, indien tevens aan de voorwaarde eener vrije diffusie van het de protopectine-aantastende agens in het weefsel is voldaan. Aangezien nu de mogelijkheid niet van de hand te wijzen is, dat deze laatste voorwaarde volstrekt niet altijd is gerealiseerd, heb ik er de voorkeur aan gegeven, de aantasting der protopectine in dunne coupe's van verschillende plantenweefsels door directe microscopische waarneming der uit protopectine bestaande elementen van het weefsel te vervolgen.

Voor eene microscopische waarneming van de inwerking van protopectinase op protopectine leent zich nu zeer goed een collenchymatisch weefsel, dat, zooals bekend is, gekenmerkt is door secundaire verdikkingen van de celwanden. In vele gevallen is de tusschenlamel hierin uitstekend waar te nemen. Zeer fraai neemt men een dergelijk collenchym o. a. waar in de hoeken van den vierkanten stengel van *Lamium album* L. Maakt men eene dwarscoupe van een alcoholpraeparaat van dezen stengel, dan is het beeld van het collenchymatisch weefsel als op Plaat II fig. 1 is weergegeven. Teneinde den gedetailleerden structuur van het weefsel beter te doen uitkomen, vervaardigde ik ook eene teekening, welke op Plaat II fig. 2 is gereproduceerd. Midden in de celwanden zijn op deze teekening de iets donker gekleurde tusschenlamellen als scherpe lijntjes weergegeven. Bij mijne proeven heb ik voor het grootste gedeelte gebruik gemaakt van alcoholpraeparaten van *Lamium album*, daar ik anders te zeer afhankelijk was van het jaargetijde. Laat men nu eene enzymhoudende vloeistof, zoowel in gekookten als in ongekookten toestand op de coupe's inwerken, dan zal men opmerken, dat bij aanwezigheid van protopectinase in den ongekookten toestand (bij aanwezigheid van een overmaat chloroform om microbenontwikkeling te verhinderen) het collenchym gaat opzwellen en na eenigen tijd gaat afscheuren, in den regel precies op de plaats, waar men de donker geteekende tusschenlamel waarneemt. Het weefsel valt geheel uiteen, op eene wijze, zooals weergegeven is op Plaat III, fig. 1 en 2, welke betrekking heeft op de inwerking van een enzympraeparaat uit *Rhizopus Oryzae*. Om nu

PLAAT II.

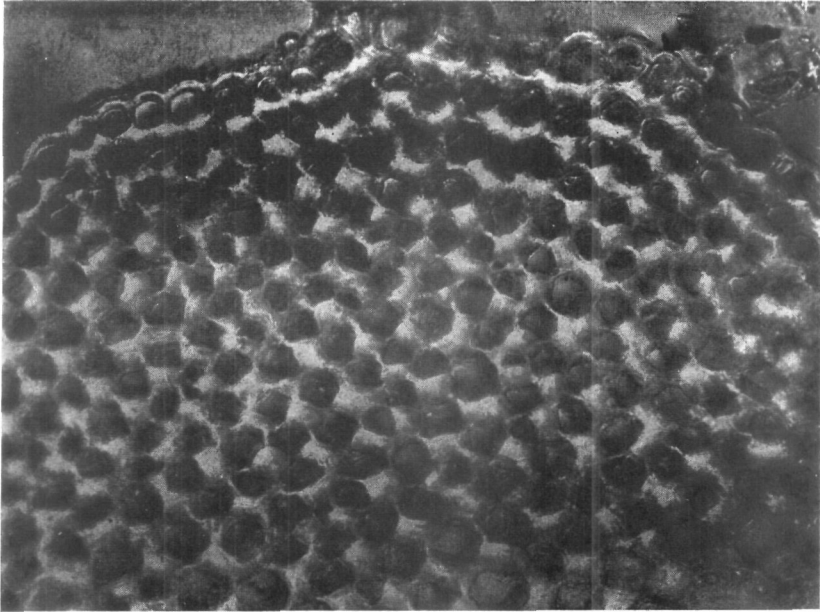


Fig. 1. Microphotographie van het collenchym in den stengel van *Lamium album* L. (alcohol-materiaal). Vergrooting: 200 \times .

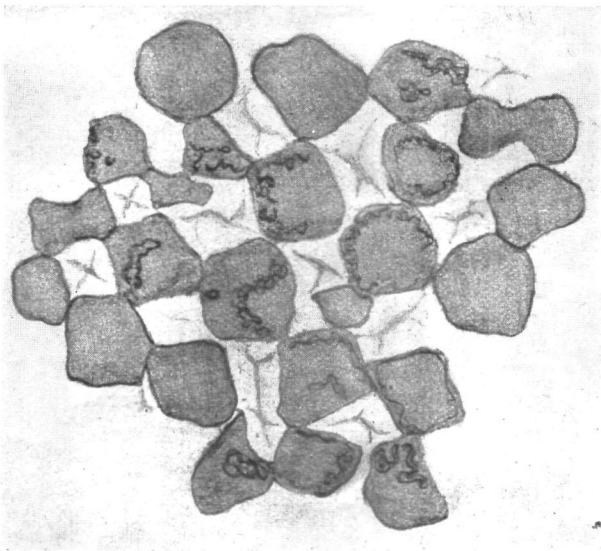
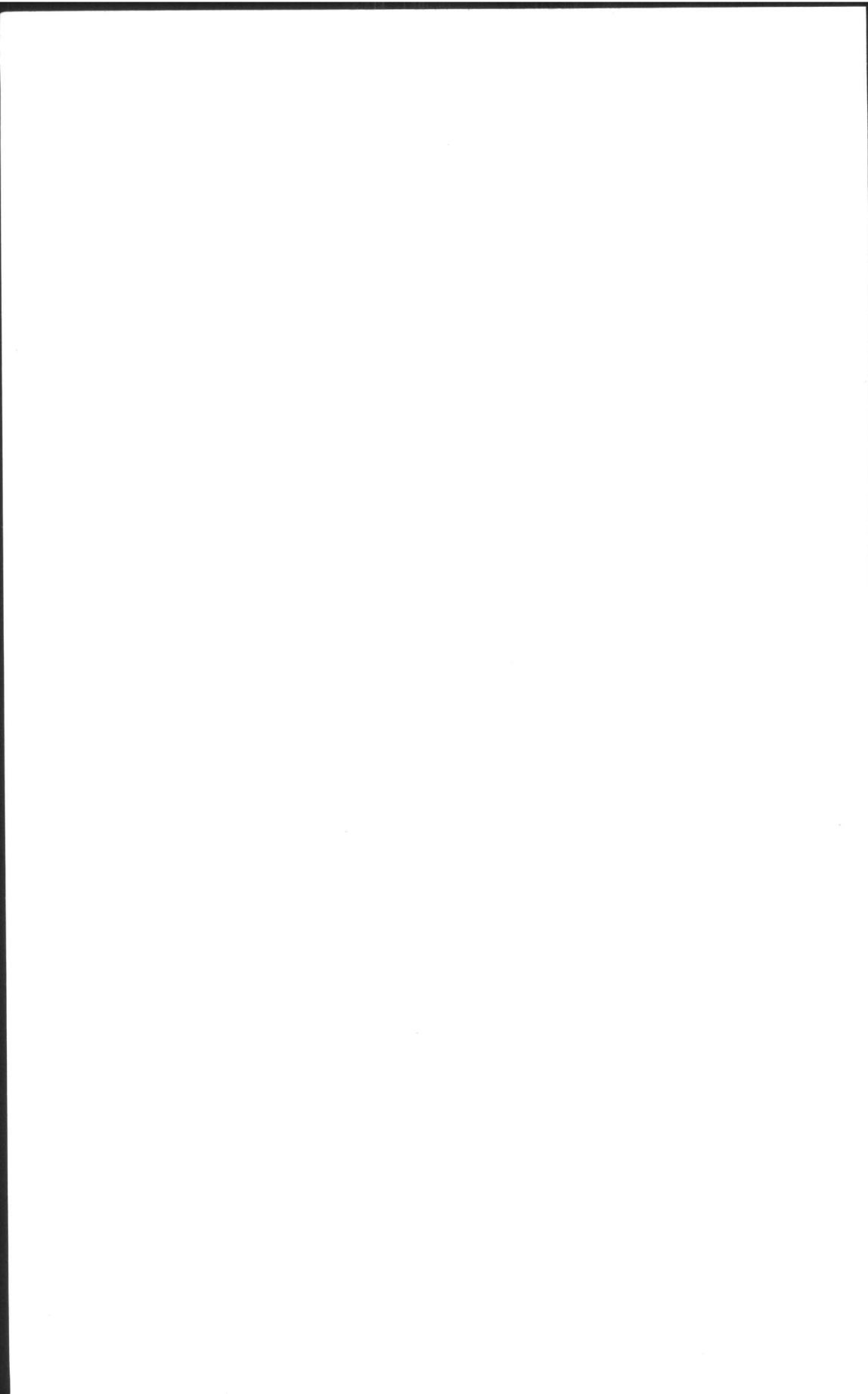


Fig. 2. Teekening van het collenchym in den stengel van *Lamium album* L. (alcohol-materiaal). Vergrooting: 450 \times .



op grond van deze waarneming tot de aanwezigheid eener protopectinase te concludeeren, moet intusschen in de gekookte enzymoplossing eene dergelijke oplossing of opzwellling van de tusschenlamellen niet waar te nemen zijn, daar anders blijkbaar het uiteenvallen door een zuiver chemischen factor wordt bewerkt.

Voor het brengen van de coupe's in de enzymvloeistof werd gebruik gemaakt van de bekende porceleinen coupehoudertjes als



in fig. 9 is aangegeven, waarmee de coupe's gemakkelijk in en uit de enzymvloeistof kunnen worden gebracht en waarin de coupe's toch goed in aanraking zijn met de enzymvloeistof.

Ter aanvulling heb ik voor het aantoonen van protopectinase in vele gevallen ook gebruik gemaakt van coupe's van het parenchymatisch weefsel van aardappelen en wortels. Het enzyme bewerkt hierbij een los raken van de cellen onderling.

Ook hier werden dan weer contrôlewaarnemingen met de gekookte enzymoplossing verricht.

§ 3. Bereiding en eigenschappen eener bacteriën-protopectinase.

Zooals in § 1 is opgemerkt, was tot dusver uitsluitend door JONES een bacteriën-protopectinase uit den door hem geïsoleerden *Bac. carotovorus* bereid. Het scheen mij nu van belang toe een dergelijke enzyme-isoleering te herhalen voor een typisch anaërobe *Clostridium*-soort, wier beteekenis voor het proces der vlasrotting zoo onmiskenbaar is komen vast te staan. Aangezien het vooral van belang was de aanwezigheid van eene protopectinase vast te stellen onder de voorwaarden, waarbij deze zich in natuurlijke media ophoopen, heb ik er van afgezien, een reïncultuur van dit organisme te maken. Deze handelwijze scheen ook daarom toelaatbaar, omdat wij over ophoopingsmethoden beschikken, welke in hooge mate selectief werken. Sedert MITSCHERLICH toch is het bekend, dat het voldoende is, om een stuk aardappel onder anaërobe voorwaarden in een relatief groot volume water te brengen en daarna bij een temperatuur van ongeveer 35° C. weg te zetten, om een bacteriënontwikkeling

te verkrijgen, waarin in de eerste tweemaal vier en twintig uur één of enkele *Clostridium*-soorten ten eenenmale overheerschen. Deze ontwikkeling pleegt dan gepaard te gaan met een zeer geprononceerde desintegratie van het aardappelweefsel, waaruit tot een krachtige protopectineaantasting mag worden besloten. Hieraan kan worden toegevoegd, dat het werkzame organisme in sommige gevallen ongetwijfeld is te identificeren met *Clostridium* (= *Granulobacter*) *pectinovorum*, welke BEIJERINCK en VAN DELDEN bij de vlasroting isoleerden, doch meestal treft men in biochemisch opzicht naverwante *Clostridium*-soorten aan.

Ik zette nu een dergelijke ophoopingsproef in en filtreerde de aan bacteriën uiterst rijke vloeistof van de aardappelresten af. Aan deze vloeistof werd nu een overmaat chloroform toegevoegd, het mengsel goed geschud en eenige dagen weggezet. Door microscopisch onderzoek overtuigde ik mij hierna er van, dat in deze vloeistof, die uiterst rijk aan sporen was, geen bacteriën in vegetatieven toestand meer aanwezig waren. De oorspronkelijke bacteriën waren dus blijkbaar geautolyseerd. Deze vloeistof werd nu bij voortdurende aanwezigheid van een groote overmaat chloroform, op de in § 2 beschreven wijze op de aanwezigheid van protopectinase onderzocht. Ter contrôle werd dit zelfde gedaan met de vloeistof, nadat deze even was opgekookt en wederom afgekoeld.

Het bleek, dat het collenchymatisch weefsel van de *Lamium*-coupe's na een halven dag staan bij een temperatuur van 35° C. in de ongekookte enzymvloeistof geheel uiteen was gevallen. Door proefnemingen op gezette tijden kon worden vastgesteld, dat de celwanden allereerst sterk opzwellen, waarbij men de tusschenlamellen zich zag verbreedden en tenslotte geheel oplossen. In de gekookte enzymvloeistof was geen verandering van de *Lamium*-coupe's te bespeuren, ook niet, wanneer men de coupe's gedurende eenige dagen in de vloeistof liet staan. Dit feit is dus wel een bewijs, dat het niet eene zuiver chemische stof was, welke de oplossing van de tusschenlamellen veroorzaakte. Ik bracht eveneens een schijfje van een rauwen aardappel en van een rauwen wortel (*Daucus Carota* L.) in de bovengenoemde vloeistoffen. Hierbij liet zich ook weer vaststellen, dat eveneens reeds na een halven dag, en in ieder geval zeer duidelijk na één dag, de schijfjes zacht waren geworden, d. w. z. dat de cellen van elkander hadden losgelaten voor zoover ze in de ongekookte enzymvloeistof hadden gelegen.

In de gekookte enzymvloeistof vertoonden de schijfjes aardappel en wortel zelfs na eenige dagen niet het minste verschijnsel van zacht worden.

Ik besloot thans na te gaan, bij welke temperatuur de *Clostridium*-protopectinase hare optimale werking vertoonde. Hiertoe werden bij temperaturen, welke met 5° opklimming van 25° C. tot 65° C. varieerden, *Lamium*-coupe's in de bewuste enzymvloeistof, welke een zuurgraad overeenkomende met $\text{pH} = 5$ bezat, gebracht. Door microscopische waarnemingen op gezette tijden kon een duidelijke maximumwerking van het enzyme worden waargenomen bij 50° C., waarbij reeds een duidelijke maceratie na omstreeks 2 uren was vast te stellen. Bij 55° C. was de werking merkbaar minder sterk, terwijl er bij 65° C. geen verandering in de *Lamium*-coupe's was te bemerken. Bij temperaturen boven 50° C. treedt dus blijkbaar een inactivering van het enzyme op.

Dit resultaat is in goede overeenstemming met de uitkomsten van JONES, die voor de protopectinase van *Bacillus carotovorus* vond, dat een verhitting gedurende 10 minuten bij 54° C. een duidelijke vermindering van activiteit bewerkte, alhoewel deze tijdsduur niet voldoende was om het enzyme volledig te inactiveren. Wel bereikte hij dit door een verhitting gedurende 10 minuten bij 63° C.

DAVISON en WILLAMAN geven voor de door hen uit *Rhizopus Tritici* bereide protopectinase aan, dat deze reeds bij ongeveer 40° C. in werkzaamheid achteruit gaat en bij 48° C. snel wordt vernietigd. Ten onrechte merken deze onderzoekers daarbij op, dat deze uitkomst in overeenstemming is met het eerder genoemde onderzoek van JONES, die volgens de beide genoemde schrijvers gevonden zou hebben, dat zijn protopectinase bij 51° C. zou worden vernietigd. Deze opgave berust klaarblijkelijk op een misverstand, daar JONES opgeeft, dat de bacteriën door 10 minuten te verhitten, op 51° C. afsterven, en dit juist als eene bereiding van een bacteriënvrij enzympraeparaat aanbeveelt.

Het verschil in uitkomsten van DAVISON en WILLAMAN eenerzijds en van JONES en van mij anderzijds, zal waarschijnlijk zijn toe te schrijven aan de verschillende herkomst der onderzochte protopectinasen, alhoewel het niet uitgesloten is, dat bijv. verschillen in zuurgraad van de verhitte oplossing hier ook een rol hebben gespeeld.

Eindelijk deed ik nog enkele waarnemingen omtrent den optimalen zuurgraad voor mijne bacteriëprotopectinase. Ik liet hiertoe weder-

om *Lamium*-coupe's eenigen tijd liggen eenerzijds in de onbehandelde enzymoplossing, welke een $pH = 5$ had, anderzijds in deze oplossing, waaraan kleine hoeveelheden azijnzuur of ammoniak in toenemende hoeveelheid waren toegevoegd. Tevoren had ik mij overtuigd, dat dezelfde hoeveelheden azijnzuur en ammoniak alleen, bij den in aanmerking komende korten tijdsduur, geen oplossende werking op de tusschenlamellen van het *Lamium*-collenchym uitoefenden.

Het bleek nu, dat de maceratie van het collenchym onmiskenbaar het snelst plaats vond bij den zuurgraad van de enzymoplossing waaraan niets was toegevoegd, waaruit mag worden besloten, dat de optimale zuurgraad voor mijne protopectinase bij een $pH = 5$ is gelegen. Opgemerkt zij, dat DAVISON en WILLAMAN voor hunne protopectinase uit *Rhizopus Tritici* volkomen dezelfde waarde hebben gevonden.

§ 4. Het aantoonen van protopectinase in verschillende schimmelsoorten.

Ofschoon het voorkomen van protopectinase in verschillende schimmelsoorten, zooals we in het vorige Hoofdstuk zagen door tal van onderzoekers buiten twijfel is gesteld, leek het mij toch gewenscht hierover nog een aantal waarnemingen te verrichten. In het bijzonder leek dit van belang in verband met de oogenschijnlijk grillige verspreiding van dit enzyme over verschillende schimmelsoorten, waarbij eenerzijds in typisch parasitaire fungi, zooals *Sclerotinia cinerea* geen protopectinase zou voorkomen, terwijl anderzijds soorten wier parasitair karakter nimmer is vastgesteld over groote hoeveelheden enzyme schijnen te beschikken.

Deze situatie deed bij mij de vraag rijzen, of niet het gebruik van uiteenlopende voedingsmedia de oorzaak kon zijn geweest van de geconstateerde onderlinge verschillen in productie van het gezochte enzyme. Het leek mij daarom gewenscht de te onderzoeken schimmelsoorten alle in éénzelfde medium te cultiveeren en hoewel protopectine feitelijk hier het meest aangewezen voedingssubstraat zou zijn geweest, heb ik in verband met de onmogelijkheid om deze stof in zuiveren toestand te isoleeren er de voorkeur aan gegeven een medium samen te stellen, waarin mijn zuiverste citroenpectinepraeparaat als enig koolstofvoedsel voorkwam. Ik strekte mijn onderzoek uit tot de volgende schimmelsoorten: *Rhizopus Oryzae*

Went et Prinsen Geerligs, *Rhizopus nigricans* Ehrenberg, *Rhizopus Tritici* Saito, *Sclerotinia Libertiana* Fuckel en *Sclerotinia cinerea* Bon. Van deze laatste soort kwamen een viertal stammen van verschillende herkomst tot onderzoek, in verband met de strijdige opgaven van andere onderzoekers aangaande het voorkomen van protopectinase bij dezen fungus. De meeste dezer schimmelsoorten waren mij door Prof. Dr. JOH. WESTERDIJK welwillend uit de verzameling van het Centraalbureau voor Schimmelcultures te Baarn afgestaan, waarvoor ik haar ook hier mijn oprechten dank betuig.

Sporen materiaal van deze schimmelsoorten werd nu geënt in steriele Erlenmeyerkolffjes van 300 cc. inhoud, waarin 100 cc. van een voedingsvloeistof was gebracht. Deze vloeistof bevatte 2% citroenpectine, 0,1% ammoniumchloride, en 0,1% KH_2PO_4 opgelost in leidingwater en was op de volgende wijze bereid.

Eene 4%-ige pectineoplossing werd getyndaliseerd, d. w. z. 3 dagen achter elkaar telkens een half uur op 100°C . verhit, waarna ze bij onderzoek steriel bleek te zijn. Deze zorgvuldige steriliseering van de pectine werd toegepast, om het eventueel ontleden van de pectine te voorkomen. Verder werd eene oplossing welke 0,2% KH_2PO_4 en 0,2% NH_4Cl bevatte, afzonderlijk gesteriliseerd door verhitting gedurende een uur bij 110°C . De pectineoplossing en de laatst genoemde oplossing werden nu, onder het nemen van de noodige voorzorgen tegen infectie, in gelijke hoeveelheden met elkaar gemengd, zoodat de gewenschte concentratie van de voedingsvloeistof werd verkregen.

De ingezette cultures werden in een thermostaat bij 22°C . geplaatst. De schimmels ontwikkelden zich zonder uitzondering vrij voorspoedig.

Nadat de verschillende fungi een maand op de pectine-vloeistof waren gegroeid, werd deze van het mycelium afgefiltreerd, daarna met overmaat chloroform geschud, waarna ik ze nog drie dagen liet staan.

Er werd op oxalaat in de enzymvloeistoffen gereageerd, wat in geen van de oplossingen aanwezig bleek te zijn. Ze reageerden alle zwak zuur. Daarna werd de vloeistof in een cylinderstopfleschje gebracht met een overmaat chloroform en hierin het protopectine-materiaal gedeponneerd.

Ik gebruikte bij deze proefnemingen zoowel *Lamium*-coupe's als ook stukjes aardappel en wortel, welke alle gedurende één nacht

in de thermostaat van 33° C. met de enzymvloeistof in aanraking bleven. Tabel XIII geeft een overzicht van de bij deze proefnemingen verkregen uitkomsten. De maximaal geconstateerde inwerking is daarin met het cijfer 5 aangegeven. Het cijfer 0 duidt aan, dat geenerlei verandering intrad.

Opgemerkt zij nog, dat een deel der enzymvloeistoffen in kolfjes met daarop aangebrachten terugvloeikoeler even werden opgekookt. Na afkoeling werden hiermede contrôleproefnemingen ingezet. In geen der gevallen werd in deze vloeistof een oplossing der tusschenlamellen geconstateerd. Wel kon men hierbij, als men de *Lamium*-coupe's er vier dagen in liet staan bij 33° C., eene geringe opzwellling van het collenchym waarnemen, doch de coupe's bleken hierbij nog in het geheel niet aan stevigheid te hebben verloren.

TABEL XIII.

Onderzoek naar de protopectinase-afscheiding door verschillende fungi.

Naam van den fungus:	Inwerking op aardappel (zacht worden)	Inwerking op wortel (zacht worden)	Inwerking op <i>Lamium</i> -collen- chym (oplossen)
<i>Rhizopus Oryzae</i> Went et Prinsen Geerlig's	5	5	5
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg	3	4	3
<i>Rhizopus Tritici</i> Saito	4	4	4
<i>Sclerotinia Libertiana</i> Fuckel	2	2	2
<i>Sclerotinia cinerea</i> Bon. No. 250	0	0	0
" " " " 209	0	0	0
" " " " 220	0	0	0
" " " " 190	0	0	0

Rhizopus Oryzae leverde dus verreweg de krachtigste enzymoplossing. Zoowel het collenchym van de coupe's van *Lamium album* — men vergelijke hiervoor plaat III fig. 1 en 2 — als de stukjes aardappel en wortel (*Daucus Carota*) waren in één dag vervloeid.

PLAAT III.

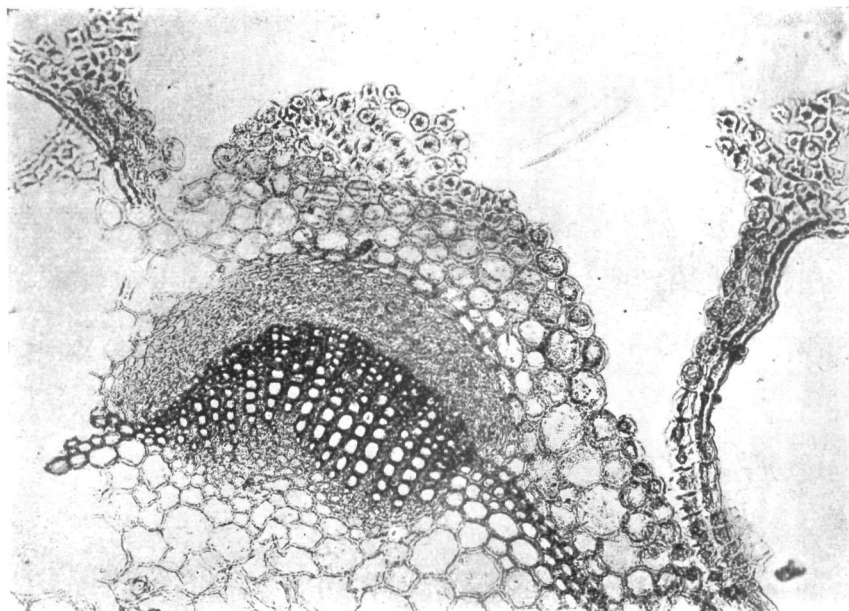


Fig. 1. Microphotographie van een deel eener coupe van den stengel van *Lamium album* L. (alcohol-materiaal) na verblijf der coupe gedurende 16 uren bij 30° C. in een protopectinase-oplossing afkomstig van *Rhizopus Oryzae* Went et Prinsen Geerlig's. Het collenchym is grootendeels in de afzonderlijke cellen uiteengevallen. Vergrooting: 60 ×.

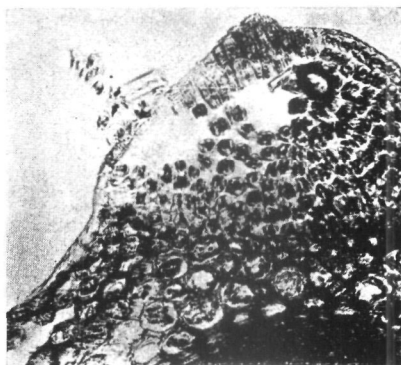
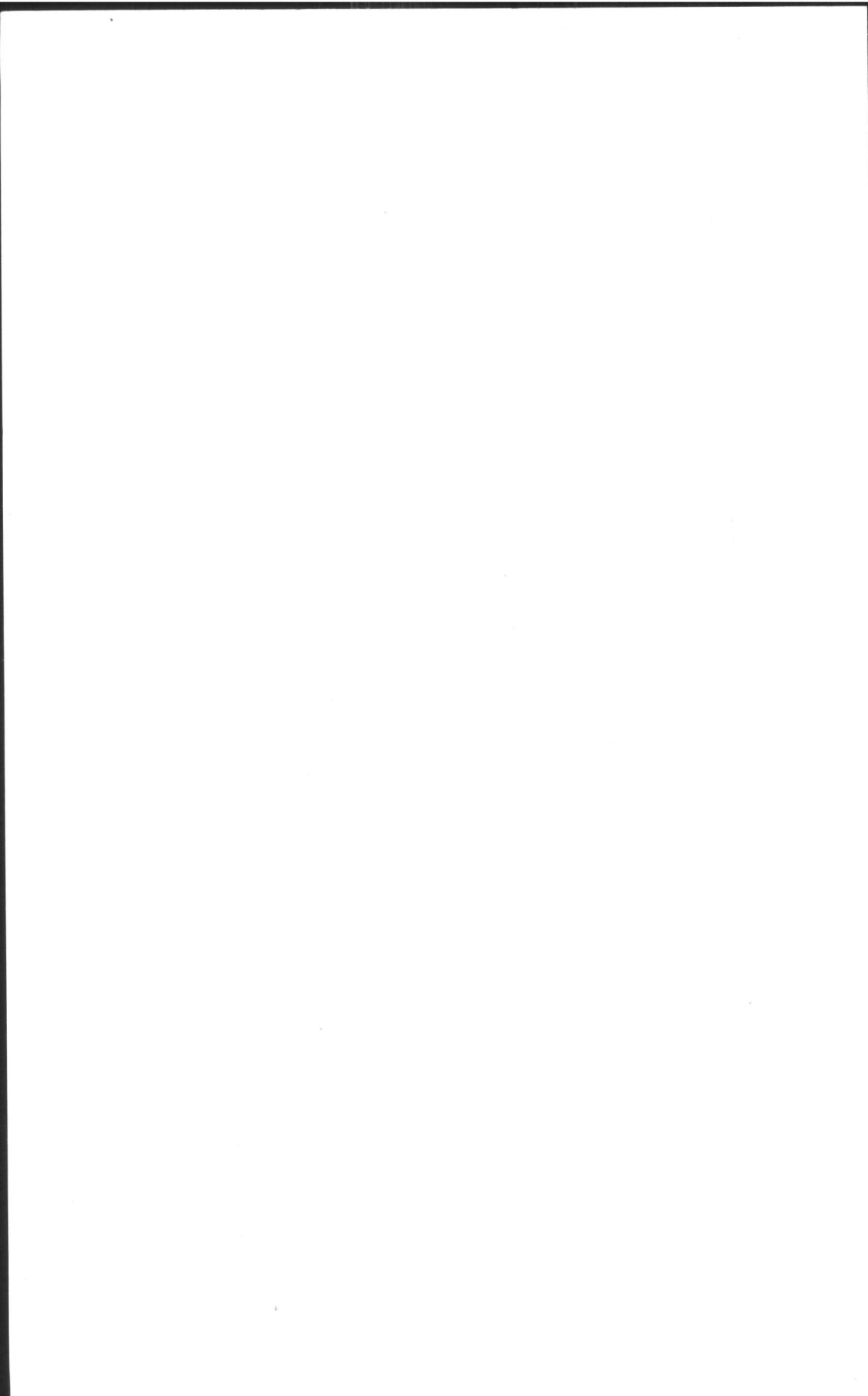


Fig. 2. Microphotographie van een ander deel der in Fig. 1 afgebeelde coupe. Hier is de epidermis nog intact, terwijl het onmiddellijk daaronder liggende collenchym in afzonderlijke cellen is uiteengevallen. Vergrooting: 48 ×.



Rhizopus nigricans en *Rhizopus Tritici* gaven, zooals de tabel weergeeft, beide een matig werkende enzymoplossing. *Sclerotinia Libertiana* leverde ook een enzyme, dat echter in verhouding tot de *Rhizopus*-soorten niet zulk eene krachtige werking vertoonde. De stammen van *Sclerotinia cinerea* leverden in geen van de gevallen een *protopectinase*-praeparaat. Dit is dus in volledige overeenstemming met de waarnemingen van DAVISON en WILLAMAN.

§ 5. De aantasting van protopectine door oxalaten en andere niet-enzymatische agentia.

Het feit, dat de in de vorige paragraaf beschreven proefnemingen — in overeenstemming met de mij eerst later ter kennis gekomen uitkomsten van DAVISON en WILLAMAN — leerden, dat *Sclerotinia cinerea* geen *protopectinase* produceert, terwijl deze fungus blijkens tal van onderzoekingen toch zulk een typische rot van verschillende vruchten veroorzaakt, deed het wenschelijk voorkomen, nog eenige nadere proefnemingen te verrichten. Men vindt toch in de literatuur vermeld, dat de jonge hyphen van genoemden fungus bij de invasie van een plantenweefsel hun weg zoeken door de tusschenlamellen van dit weefsel en dit houdt onafwijsbaar in, dat daar ter plaatse *protopectine* in oplossing wordt gebracht. Indien de fungus geen *protopectinase* afscheidt, zal men moeten aannemen, dat er bij den groei in het weefsel bepaalde stofwisselingsproducten door den fungus worden afgescheiden, welke de *protopectine* aangrijpen. In het door mij gebruikte voedingsmedium zouden deze stofwisselingsproducten dan niet worden gevormd, daar anders zoowel de gekookte als de ongekookte vloeistof werkzaam had moeten zijn. Wij zagen reeds, hoe door verschillende onderzoekers in dit verband de aandacht werd gevestigd op de bij de schimmelontwikkeling veelvuldig optredende oxalaten. Gezien de min of meer tegenstrijdige opgaven, welke over den invloed van oxalaten op de *protopectine* van verschillende plantenweefsels in de literatuur voorkomen, leek het mij gewenscht hierover zelf waarnemingen te verrichten.

Alvorens echter mijn uitkomsten hier weer te geven, wil ik trachten hieronder eerst de literatuur over dit speciale punt kort samen te vatten. Wij zagen reeds in Hoofdstuk VIII, dat DE BARY de eerste was, die de aandacht vestigde op de groote productie van oxaalzuur door de door hem bestudeerde *Sclerotinia*

Libertiana, zoowel bij cultuur in synthetische media als bij de parasitaire leefwijze van deze schimmel. Opzettelijk verrichte proefnemingen gaven DE BARY ¹⁾ evenwel de overtuiging, dat oxaalzuur en oxalaten hoogstens ten deele voor de vergiftige werking, welke van de schimmelhyphen op de cellen van het plantenweefsel uitgaat, doch in het geheel niet voor de oplossende werking op de tusschenlamellen in dit weefsel, verantwoordelijk konden worden gesteld.

Hiertegenover geeft SMITH ²⁾ uitdrukkelijk aan, dat ook het gekookte extract van *Botrytis cinerea* zoowel nog in staat is het weefsel van de voedsterplant te doden, als om daarin het celverband te verbreken. Hij schrijft deze werking van het gekookte extract zeer bepaald toe aan de daarin voorkomende oxalaten en ondersteunt deze zienswijze door proefnemingen, waarbij hij eenzelfde effect bewerkt met verdunde oplossingen van oxaalzuur. SMITH wijst er in dit verband op, dat hij in sommige cultures van de genoemde schimmel tot 2% oxaalzuur kon aantreffen.

COOLEY ³⁾ volstaat er mee, de aandacht te vestigen op het voorkomen van oxalaten in door *Sclerotinia cinerea* aangetaste perziken en pruimen en laat in het midden, in hoeverre deze zouten een rol spelen bij het oplossen der tusschenlamellen.

VALLEAU ⁴⁾ verrichtte op dit punt experimenteele waarnemingen en vond, dat oxaalzuur wel het weefsel van pruimen en perziken, maar niet dat van aardappels desintegreerde.

Eindelijk is nog melding te maken van de na beëindiging mijner eigen proefnemingen gepubliceerde waarnemingenreeks van DAVISON en WILLAMAN. Deze vonden, dat in oplossingen van 0,25% ammoniumoxalaat, 0,3% kaliumoxalaat en 0,25% natriumoxalaat bij zeer gevarieerden zuurgraad geenerlei maceratie optrad in weefsels van aardappel, appel, citroen en wortel. Nadere bijzonderheden over de wijze van uitvoering dezer proefnemingen ontbreken hier evenwel.

Ik besloot bij mijn proefnemingen mij niet tot oxaalzuur en oxalaten te beperken, doch zeer in het algemeen na te gaan, hoe

¹⁾ A. DE BARY, Bot. Zeit. 44, pag. 393 en 409, (1886).

²⁾ R. E. SMITH, Bot. Gaz. 29, pag. 359, (1900); Ibid. 33, pag. 421, (1900.)

³⁾ J. C. COOLEY, Ann. Missouri Bot. Garden 1, pag. 291, (1914).

⁴⁾ W. D. VALLEAU, Journ. Agr. Res. 5, pag. 365, (1915).



PLAAT IV.

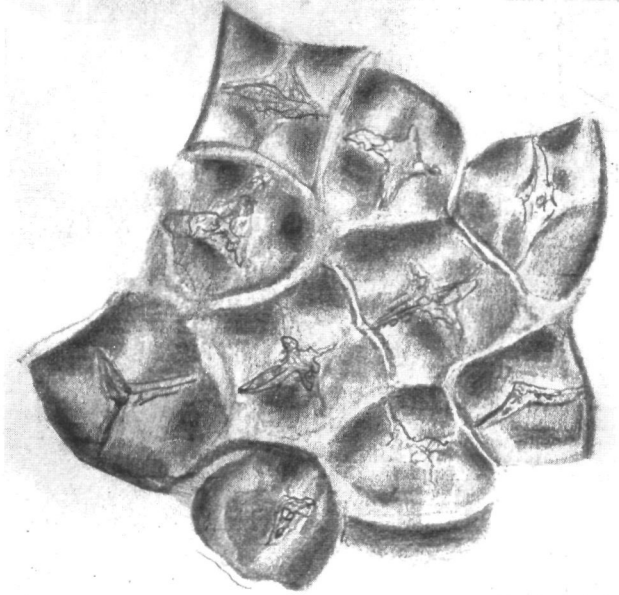


Fig. 1. Teekening van het collenchym van *Lamium album* L. (alcohol-materiaal) na verblijf der coupe gedurende één dag in 1% azijnzuur. De celwanden zijn zoo sterk gezwollen, dat het cellumen een spleetvormige gedaante heeft aangenomen. Vergrooting: 450 \times .

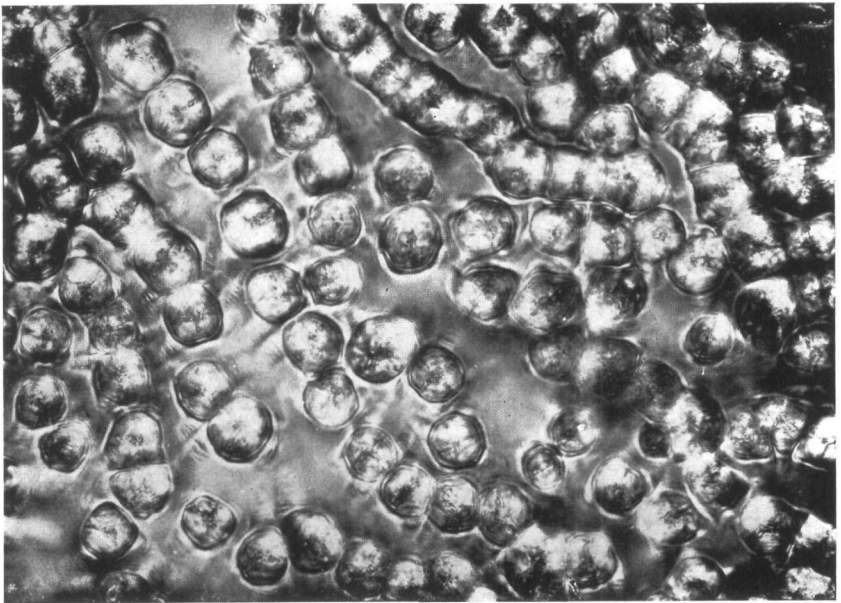


Fig. 2. Microphotographie van het collenchym van *Lamium album* L. (alcohol-materiaal) na verblijf der coupe gedurende 2 dagen bij 30° C. in een 1%-ige oplossing van neutraal kaliumoxalaat. Vergrooting: 200 \times .

het celverband door zeer uiteenlopende anorganische en organische zuren en zouten wordt beïnvloed.

Ik ging hierbij als volgt te werk:

De coupe's van *Lamium album*, welke ook voor de protopectinase-werking waren gebruikt, werden in een coupehouder gebracht in een 1%-ige oplossing van de te onderzoeken stoffen. Aan de oplossingen, die bij 35° C. werden weggezet, werd chloroform in overmaat toegevoegd. Het resultaat van het onderzoek na 24 uren inwerken is in tabel XIV weergegeven.

Wij zien uit tabel XIV, dat in alle zuur-reagerende vloeistoffen een doorgaans sterke zwelling van den geheelen celwand plaats vindt. Intusschen leidt dit in den beschouwdens tijdsduur niet tot een verbreken van den celwand, zoodat geconcludeerd moet worden, dat de protopectine intact gebleven is. Plaat IV fig. 1 geeft een beeld van den toestand van het *Lamium*-collenchym na het verblijf in azijnzuur. Bij een langer verblijf in deze zure oplossing trad evenwel wel een desintegratie van het weefsel op, welke — daar zij niet door waarneembare veranderingen in de tusschenlamel was voorafgegaan — den indruk maakte, geheel een mechanisch gevolg te zijn van de ingetreden sterke zwelling. Oxaalzuur week in zijn gedrag niet van dat der overige zuren af. Daarentegen was bij zuur kaliumoxalaat naast de zwelling van den celwand ook een zeer goed waarneembare verbreeding van de tusschenlamel op te merken. Weer een eenigszins ander beeld vertoonde de reeks neutrale kaliumzouten van lactaat tot en met phtalaat, waaronder het neutrale kalium-oxalaat. De celwanden waren hier namelijk slechts weinig gezwollen, terwijl hiertegenover een onmiskkenbare oplossing van de tusschenlamel, gepaard gaande met een plaatselijke verbreking van het celverband, was aan te treffen. Plaat IV fig. 2 geeft een beeld van den toestand van het *Lamium*-collenchym na een verblijf van 2 dagen in neutraal kalium-oxalaat. In scherpe tegenstelling hiermede was het gedrag van kalium-acetaat dat geenerlei verandering had teweeggebracht.

Verder moet worden vastgesteld, dat de neutraal-reagerende anorganische zouten, alsmede de neutraal-reagerende calciumzouten der organische zuren — ook indien daarnaast een overmaat kaliumzouten van de zelfde zuren voorkwam — geenerlei inwerking hadden uitgeoefend. Daaraan is dan nog slechts toe te voegen, dat

TABEL XIV.

Inwerking van eenige anorganische en organische zuren en zouten op coupe's van *LAMIUM ALBUM* L.

Oplossing	Concentratie	Reactie	Beeld van het collenchymatisch weefsel in de coupe's van <i>Lamium album</i> L.
Zwavelzuur	1 %	zuur	Sterke opzwellung van den geheelen celwand, celverband nog intact
Zoutzuur	1 %	zuur	" " " " " " " " " "
Azijnzuur	1 %	zuur	" " " " " " " " " "
Oxaalzuur	1 %	zuur	" " " " " " " " " "
Citroenzuur	1 %	zuur	" " " " " " " " " "
KHSO ₄	1 %	zuur	" " " " " " " " " "
KHCO ₃	1 %	zwak alk.	" " " " " " " " " " Onveranderd
NaHCO ₃	1 %	zwak alk.	" " " " " " " " " " " "
Zuur K-oxalaat	1 %	zuur	Zwelling v. d. celwand, verbreding tusschenlamel, celverband nog intact
K ₂ SO ₄	1 %	neutraal	Onveranderd
KCl	1 %	neutraal	" " " " " " " " " "
K ₂ CO ₃	1 %	alk.	Sterk gezwollen celwand, tusschenlamel opgelost, celverband verbroken
Na ₂ CO ₃	1 %	alk.	" " " " " " " " " " " "
K-acetaat	1 %	neutraal	Onveranderd
K-lactaat	1 %	zwak zuur	Celwanden iets gezwollen, tusschenlamel opgelost, celverb. plaatsel. verbroken
K-oxalaat	1 %	neutraal	Celw. iets gezw., tusschenlamel hier en daar opgel., " " " "
K-malaat	1 %	neutraal	" " " " " " " " " " " "
K-tartraat	1 %	neutraal	" " " " " " " " " " " "
K-citraat	1 %	zwak zuur	Celw. gezw., tusschenlamel hier en daar opgelost, " " " "
K-phtalaat	1 %	zuur	Celwanden erg gezwollen, tusschenlamel opgelost, celverband verbroken
K-oxalaat+Ca-oxalaat	1% + zooveel mogelijk	neutraal	Onveranderd
K-lactaat+Ca-lactaat	1 % + 1 %	neutraal	"
Ca-lactaat	1 %	neutraal	"
Ca-malaat	bijna 1 %	neutraal	"
Ca-tartraat	zeer weinig	neutraal	"
Ca-citraat	zooveel mogelijk	neutraal	"

de alkalisch reagerende alkalicarbonaten naast een zwelling van den celwand, ook een volledige oplossing van den tusschenlamel hadden tot stand gebracht, waardoor het celverband geheel was verbroken.

Wat moeten wij nu uit deze waarnemingen concluderen? In de eerste plaats, dat vloeistoffen met een hoogen zuurgraad oogenschijnlijk de protopectine van het *Lamium*-collenchym onaangetast laten, terwijl deze in wat meer geprononceerd alkalische vloeistoffen oplost. Maar ook de kaliumzouten der meeste organische zuren, waaronder oxaalzuur, bewerken eveneens een in oplossing gaan der protopectine, welk proces door een zwak zure reactie schijnt te worden ondersteund. In tegenstelling hiermede is kaliumacetaat zonder invloed. Dit maakt het verleidelijk verband te zoeken tusschen de relatief geringe oplosbaarheid der calciumzouten van de eerstgenoemde zuren en hun gedrag ten opzichte van het weefsel. Men zou hierin een aanwijzing kunnen zien, dat toch, overeenkomstig de meening van MANGIN, calcium een essentieel bestanddeel vormt van de protopectine der beschouwde tusschenlamellen. Dat evenwel de pectinestof der tusschenlamel niet enkel een calciumzout is van de zure pectine volgt uit de door mij — althans voor citroenpectine — geconstateerde goede oplosbaarheid van dit zout in water. Waarschijnlijker is dus de voorstelling, dat wij in de *Lamium*-protopectine te doen hebben met een verbinding van laatst genoemd zout met hemicellulosen, welke verbinding hetzij door het verbreken van de binding van pectinestof en hemicellulose (protopectinasewerking), hetzij door dubbele omzetting van de calciumhoudende protopectine met de alkalizouten der eerder aangeduide organische zuren in een overeenkomstige, doch oplosbare alkaliprotopectine wordt veranderd, waarbij de „kit”-werking verloren gaat. Het gedrag der sterk zuur reagerende vloeistoffen zou dan zijn verklaring kunnen vinden, doordat de zure verbinding, welke bij de onttrekking van calcium uit protopectine ontstaat, eveneens onoplosbaar is en althans tijdelijk de „kit”-werking kan overnemen.

De hierboven beschreven proefnemingen leveren nu een sterke aanwijzing ten gunste van de opvatting, dat inderdaad meer geconcentreerde oplossingen van alkalioxalaten, zooals die onder den invloed van in plantenweefsel binnendringende fungi buiten twijfel kunnen ontstaan een essentieel element kunnen vormen bij het verbreken van het celverband van het aangetaste weefsel, wat dus

als een bevestiging van de oude waarnemingen van SMITH mag worden beschouwd. Maar tevens volgt uit het waargenomen gedrag van zuur kaliumoxalaat en van vrij oxaalzuur, dat de zuurgraad hierbij een zeer belangrijke rol speelt.

De opmerkelijk goede macereerende werking, welke ik bij het *Lamium*-collenchym had vastgesteld voor de neutrale kaliumzouten van vele organische zuren, deed bij mij den wensch ontstaan vast te stellen, in hoeverre hiervan wellicht partij kon worden getrokken bij het in technisch opzicht belangrijkste pectine-oplossingsprocédé, n.l. de vlasrotting. Ik verrichtte daarom eenige proefnemingen aangaande de werking van kaliumoxalaat. De gebruikte vlasstengels, welke tevoren in water waren opgeweekt, werden in 0,5- en 1,0%-ige oplossing van kaliumoxalaat gedompeld. Het bleek mij nu, dat in beide oplossingen reeds binnen twee uren een zeer volledige „rotting” had plaats gevonden. Het cambium en de tusschenlamellen van het parenchymatisch weefsel van den vlasstengel zwollen eerst op en losten daarna geheel op. De vezelbundels daarentegen bleken onaangetast.

Een verdere waarneming leerde mij, dat hetzelfde effect eveneens werd verkregen, door gedurende tien minuten met 1%-ige kaliumoxalaatoplossing te koken. Bij voortgezet koken, doch alleen op den langen duur, worden blijkbaar ook de tusschenlamellen van de elementairvezels aangegrepen en slaagt men er met eenige moeite in de elementairvezels van elkaar te trekken.

Opgemerkt zij nog, dat ik kon aantonen, dat er bij de koude behandeling van vlas met kaliumoxalaat pectinestoffen in oplossing gaan, daar de vloeistof met alcohol een gelatineus neerslag geeft, waarin ik nog de aanwezigheid van veresterden methylalcohol kon aantonen.

De verkregen vlasvezels hadden een opmerkelijk fraaie witte kleur. Dit feit gecombineerd met het merkwaardig snelle verloop van het proces doen het allerminst uitgesloten voorkomen, dat van de aangegeven werkwijze nog eens in de praktijk profijt zal kunnen worden getrokken. Van de overige bekende chemische „rottings”-werkwijzen onderscheidt de hier beschreven methode zich gunstig doordat hierbij, evenals bij de biologische rotingsmethoden, een streng selectieve werking op de pectinestoffen plaats heeft.

In aansluiting op de proeven met *Lamium*-collenchym en vlas

bestudeerde ik de inwerking van het kaliumoxalaat op de wellicht het best te observeeren pectineformaties n.l. de door MANGIN beschreven pectinestaafjes in het stengelweefsel (vlak onder de knopen) van *Equisetum arvense* L. Duidelijk kon onder het microscoop de aantasting dezer staafjes, wanneer men de betreffende coupe's in een 1%-ige oplossing van kaliumoxalaat legde, worden vervolgd. Binnen twee uur waren de staafjes geheel opgelost.

Terwijl de voorafgaande proefnemingen er alle voor spraken, dat aan neutrale oxalaten een belangrijke protopectine-oplossende werking moest worden toegeschreven, waren de afwijkende uitkomsten van DAVISON en WILLAMAN voor mij aanleiding om de werkzaamheid van deze zouten ook nog eens te toetsen aan weefsels, welke ook door genoemde onderzoekers waren gebruikt. In het bijzonder kwamen hiervoor in aanmerking de weefsels van wortel en aardappel, welke ik ook voor het protopectinase-onderzoek gebruikte.

Tegen mijne verwachting in bleek nu hierbij van een macereerende werking van neutraal kaliumoxalaat zelfs in 2%-ige oplossing geen sprake te zijn. Daarentegen bewerkte een oplossing van zuur kaliumoxalaat na langen tijd een beginnende desintegratie van het weefsel. Toen ik evenwel schijfjes aardappelen en wortelen bracht in een 1 of 2%-ige oplossing van vrij oxaalzuur trad binnen 24 uur een zeer duidelijk zacht worden van deze weefsels in. Daarentegen bleef een 2%-ige oplossing van azijnzuur zelfs na vele dagen practisch zonder uitwerking. Wij moeten dus concludeeren, dat de protopectine in deze weefsels anders geconstitueerd is, dan in de eerdergenoemde. Het feit, dat ook 1% zoutzuur een resultaat gaf, dat met dat van de oxaalzuuroplossing nagenoeg op één lijn was te stellen, doet het waarschijnlijk voorkomen, dat het waargenomen effect vóór alles aan de waterstofionenconcentratie moet worden toegeschreven, welke de protopectine blijkbaar ontleedt.

Bij verdere onderzoekingen over de inwerking van oxaalzuur en zijne zouten op protopectine-houdende tusschenlamellen van hogere planten zal dus rekening moeten worden gehouden met de omstandigheid, dat verschillende weefsels protopectinen van verschillende constitutie bevatten, m. a. w. dat daarin de eigenlijke pectine op uiteenloopende wijze is gebonden. De in de literatuur aanwezige tegenstrijdigheden aangaande den invloed van oxalaten op plantaardige weefsels vinden in dit gezichtspunt althans ten deele hare verklaring.

§ 6. De enzymen, welke werkzaam zijn bij de omzettingen der pectinestoffen tijdens het „rot”-worden van den mispel.

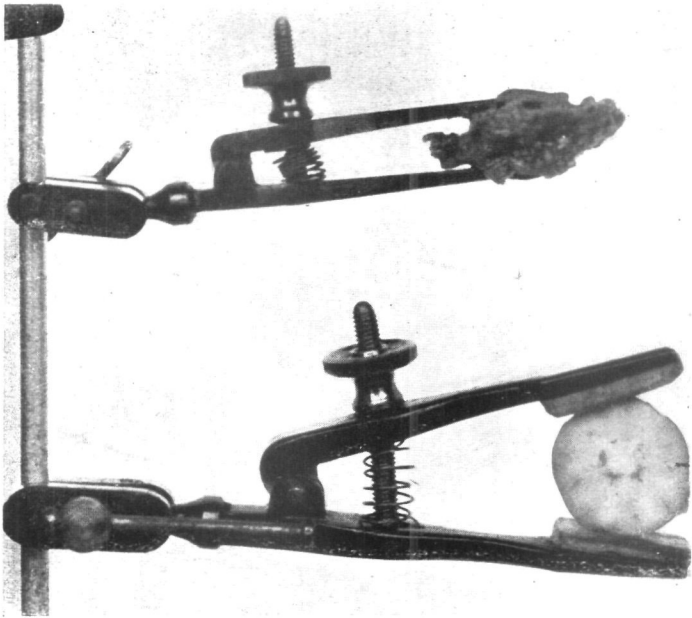
In de Inleiding is er op gewezen, dat het optreden van pectinase in cellen van hogere planten tot dusver op één enkele uitzondering na niet is aangetoond. De mispelvrucht scheen Prof. VAN ITERSON nu een gunstig object voor een onderzoek naar de aanwezigheid van dit enzym. De eigenaardige veranderingen, welke intreden bij het zoogenaamde „rot”-worden van deze vrucht, doen het waarschijnlijk voorkomen, dat hierbij omzettingen van pectinestoffen een belangrijke rol zullen spelen. Alvorens verslag uit te brengen over de door mij op dit punt verrichte onderzoekingen, wil ik er op wijzen, dat de aanduiding „rot-worden” een geheel onjuiste benaming is voor de bewuste verandering. Het woord rotting dient toch gereserveerd te blijven voor een aantasting door micro-organismen, welke hierbij geenszins in het spel zijn. We hebben hier slechts met een rijpingsproces der vrucht te maken en de optredende verschijnselen worden dan ook, blijkens het onderzoek van GRIEBEL (l. c.), in hoofdzaak teruggevonden bij de vruchten van verschillende *Pirus*- en wellicht ook van sommige *Prunus*-soorten.

De overgang in den zoogenaamden rotten toestand geschiedt bij den mispel meestal zeer plotseling. Terwijl de vruchten den eenen dag nog hard zijn en dan een wrangen smaak bezitten, ziet men enkele dagen later, dat ze reeds voor een groot gedeelte van binnen uit zacht en bruingekleurd zijn geworden. Eerst na dit „rot”-worden, zijn de vruchten eetbaar.

Om nu te onderzoeken, of dit „rot”-worden eene enzymwerking was, heb ik de volgende proeven gedaan:

1e. Van een mispel, waarvan het binnenste gedeelte reeds een begin van „rot” vertoonde, maar die verder nog geheel hard was, werden twee schijfjes afgesneden. Eén van de schijfjes werd in een glas met water 10 min. op 80° C. verwarmd, waarna het in koud water werd gebracht en nog geheel hard bleek te zijn. Nu werden de beide schijfjes gebracht in een glasdoos, met ingeslepen deksel, waarin tevens een bakje met chloroform was geplaatst. Na een uur kon men reeds waarnemen, dat het schijfje, dat niet verwarmd was geweest, donkerbruin werd en dat men met een dun glasstaafje er in kon prikken. Bij onderzoek bleek, dat hier de cellen geheel

PLAAT V.



Photographie, welke een indruk geeft van de consistentie van twee schijven van de mispelvrucht (*Mespilus germanica* L.), waarvan de bovenste onbehandeld is, terwijl in de onderste de enzymen door verhitting zijn vernietigd.

van elkaar hadden losgelaten, terwijl in het te voren verhitte schijfje het celverband geheel bewaard was gebleven. Dit laatste schijfje was dan ook nog geheel hard en vertoonde ook geen verkleuring.

Op grond van deze waarnemingen mocht nu reeds met groote waarschijnlijkheid tot de aanwezigheid van protopectinase in de mispelcellen worden geconcludeerd. De proefneming laat toch alleen de interpretatie toe, dat in de mispelcellen een protopectinase voorkomt, die daarin, zoolang de cellen levend zijn, gelocaliseerd is, zoodat daarvan geen werking op de protopectine der tusschenlamellen uitgaat. Doodt men nu de cellen door verwarming, dan wordt tevens de protopectinase vernietigd en veranderd er dus niets in den samenhang van het weefsel. Brengt men daarentegen de levende mispelcellen in een chloroform-atmosfeer, dan wordt het protoplasma gedood, terwijl de protopectinase werkzaam blijft en hare localisatie in de cel wordt opgeheven. Onder deze omstandigheden wordt de protopectine der tusschenlamellen opgelost en dus het celverband verbroken. Een beeld van het verschil van deze twee schijven van eenzelfden mispel geeft Plaat V, waarin men de niet verhitte schijf geheel tot een bruin moes ziet plat gedrukt, terwijl de verhitte schijf aan een dergelijken druk weerstand heeft geboden en nog de oorspronkelijke consistentie en kleur heeft behouden. De donkere kleur bij de niet verhitte schijf is waarschijnlijk eveneens aan eene enzymwerking te wijten; het is denkbaar, dat het ook hier — evenals bij den aardappel — de tyrosinase is, die uit tyrosine eene bruine kleurstof doet ontstaan.

Men zou tegen het bovenstaande aan kunnen voeren, dat bij de verhitting van de mispelschijf in warm water, de zuren, die de schijf bevatte, in oplossing waren gegaan en dat het deze zuren waren, die in de onbehandelde schijf de tusschenlamellen tot oplossing brachten. Om dit na te gaan, heb ik de schijven ook in een droge glasdoos eenigen tijd in een broedstoof op 100° C. gebracht (ongeveer 15 min.). Ook dan was het enzyme gedood en bleek de mispel in een chloroformatmosfeer geen zacht worden meer te vertoonen.

Liet men onverhitte schijven gedurende denzelfden tijd in een glasdoos liggen, waarin geen chloroform aanwezig was, dan bleef de schijf nog gedurende één of twee dagen vrij hard. De cellen bleven dan nog in levenden toestand en de protopectinase bleef in het protoplasma of in het celvocht gelocaliseerd.

Vermeldenswaard is het, dat, wanneer ik schijven van een mispel

nam, die nog te onrijp was, bovengenoemde rotting in een chloroformatmosfeer niet intrad. De protopectinase schijnt dus eerst in een bepaald stadium van de rijping der vrucht te ontstaan.

Ter nadere ondersteuning van de zienswijze, dat in „rot” geworden mispels een krachtige protopectinase aanwezig is, bereidde ik een enzymatisch extract van dergelijke mispels. Een aantal hiervan werd met water opgewreven en uit deze massa de vaste bestanddeelen door centrifugeeren verwijderd. Liet men deze vloeistof in tegenwoordigheid van chloroform weer op *Lamium*-coupe's inwerken, dan bleek na één à twee dagen het collenchym weer een duidelijke opzwellling en een uiteenvallen van de cellen onderling te vertoonen. In de tevoren gekookte oplossing bleef dit verschijnsel weer geheel achterwege.

Een schijfje aardappel in ongekookt mispelsap gebracht, was in korten tijd ook geheel in losse cellen uiteengevallen, terwijl ook coupe's van een aardappel in dit mispelsap binnen korten tijd geheel hun stevigheid verloren. Werd een rotte halve mispel op een dikke schijf aardappel gelegd, dan was deze aardappel in een halven dag reeds geheel tot moes geworden.

Intusschen bleek het mij, dat de protopectinase niet het eenige in den „rotten” mispel aanwezige pectinestoffen-omzetzende enzyme is. Toen ik namelijk een aantal „rotte” mispels had uitgeperst, bleek het hierbij verkregen troebele sap, nadat ik het een nacht had laten staan, zich geheel in een vaste gelei te hebben omgezet. Dit wees dus op de aanwezigheid van pectase, welke zienswijze nader kon worden bevestigd, doordat ik na afdestilleeren der gelei in het destillaat met de reactie van DENIGÈS een aanzienlijke hoeveelheid methylalcohol kon aantoonen.

Voorts kon de aanwezigheid van pectase in de rotte mispels ook met behulp van de eerder beschreven lakmoesplatenmethode worden aangetoond. Hiertoe werd eene hoeveelheid mispels met scherp gemalen kwarts in een mortier opgewreven, daarna in een pers het sap er uit geperst en dit regelrecht in alcohol opgevangen. Er sloeg eene gelatineuze massa in den alcohol neer, die naast veel pectine ook pectase bleek te bevatten. Dit neerslag werd afgefiltreerd en gedroogd. Op een lakmoesplaat gebracht, vertoont deze stof, nadat ze met wat water eerst tot een papje is opgewreven, na 24 uren eene duidelijke roode vlek, terwijl ze dit verschijnsel, wanneer men de stof eerst kookt, niet vertoont. Zoowel met de pectine uit het

poeder zelf als met de pectine in de plaat vormt dus de pectase blijkbaar pectinezuur.

Dat intusschen pectase niet alleen verantwoordelijk kan worden gesteld, voor de bij het „rot” worden van den mispel intredende pectinemetamorphose, bleek mij uit de volgende proefneming, waarbij ik op een als boven beschreven droog verhitte mispelschijf, welke in het goede rijpingsstadium verkeerde een uit wortelen bereide pectaseoplossing liet inwerken. Hierbij trad namelijk geenerlei verandering in de consistentie van den mispelschijf in.

Op grond van de bovenstaande waarnemingen, kan men zich nu de volgende voorstelling maken van de pectinemetamorphose bij het „rot” worden der mispelvrucht. De in deze vruchten aanwezige protopectinase zal de protopectine in de eerste plaats in pectine omzetten en deze laatste stof zal daarna onder den invloed van pectase in een geleiachtig pectinezuur worden omgezet. Speciale vermelding verdient, dat — zooals in § 7 zal blijken — de mispel geen pectinase blijkt te bevatten. De rotte mispel toch behoudt, in een chloroform-atmosfeer bewaard, zelfs na een jaar haar geleiachtige consistentie.

Ongetwijfeld spelen zich naast de bovenaangeduide omzettingen der pectinestoffen, nog verschillende andere biochemische processen af, waarbij de aanwezige zuren en koolhydraten veranderingen ondergaan. Daarbij zullen onder meer esters worden gevormd, die aan den rotten mispel haar eigenaardigen reuk verleenen. Zeer zeker evenwel dragen de pectinestoffen er niet weinig toe bij, om den mispel, wanneer zij zoogenaamd „rot” is geworden, haar typische consistentie en smaak te geven.

§ 7. Waarnemingen omtrent het voorkomen van pectinase.

Zooals in § 1 is opgemerkt, was ten tijde, dat ik mijn onderzoek naar het voorkomen van pectinase aanving, dit enzyme nog slechts in één enkel plantenmateriaal, namelijk gekiemde gerst — behoudens dan de min of meer incidenteele, in Hoofdstuk VIII genoemde, waarneming van BEIJERINCK en VAN DELDEN — aangetoond.

Alvorens mijn eigen waarnemingen hier weer te geven, wil ik nog eens uitdrukkelijk voorop stellen, dat ik hier onder pectinase versta het enzyme, dat in staat is pectinezuur in zijn bouwsteen te ontleden. Hoewel BOURQUELOT en HÉRISSEY, evenals DAVISON

en WILLAMAN, het als een uitgemaakte zaak beschouwen, dat pectinase ook in staat is pectine in haar bouwsteen te ontleden, lijkt mij dit nog aan twijfel onderhevig. De door genoemde onderzoekers gerapporteerde positieve uitkomsten in dit opzicht kunnen evenzeer te wijten zijn aan het voorkomen eener pectase naast de pectinase in het onderzochte enzymatische materiaal. Eenerzijds is het dus mogelijk, dat pectinase alleen dan pectine aangrijpt, wanneer er gelijktijdig pectase voorkomt, anderzijds is het denkbaar, dat de pectinase naast haar vermogen om pectinezuur in de bouwsteen te ontleden, zelf ook in staat is, methylalcohol van de pectine af te splitsen. Een beslissing in deze zou slechts kunnen worden verkregen, indien men er in zou slagen het bestaan te bewijzen van een pectinezoursplitsend enzyme, dat de pectine onaangetast laat. Reeds dadelijk zij opgemerkt, dat dit geval zich bij de door mij onderzochte materialen nimmer heeft voorgedaan.

Ter oriëntering herhaalde ik in de eerste plaats de proefnemingen van BOURQUELOT en HÉRISSEY en bereidde volgens het voorschrift van deze onderzoekers een enzymatisch extract uit gekiemde gerst. Voor het onderzoek op pectinase bracht ik in het extract, waaraan ik een overmaat chloroform had toegevoegd, een pectinezuurgel, welke ik had bereid door vermenging van eene gelijke hoeveelheid van eene 2%-ige pectineoplossing en van een wortelpectaseoplossing. Indien het extract pectinase zou hebben bevat, zou het gel hebben moeten versmelten, hetgeen niet geschiedde, zelfs niet na een paar weken.

Werd het met chloroform behandelde moutextract daarentegen bij een oplossing van pectine gebracht, dan trad na eenigen tijd gelvorming op, hetgeen dus de aanwezigheid van pectase in dit extract bewijst. Dit gel versmolt evenwel niet, ook niet op den duur. Ook in tegenwoordigheid van krijt was geen pectinase in het extract aan te toonen.

Talrijke herhalingen van deze proefnemingen met mout van verschillende herkomst brachten geen verandering in dit resultaat.

Ik ging thans over tot een onderzoek naar het voorkomen van pectinase in fungi, waarvoor ik dezelfde soorten nam, die ook op protopectinase waren onderzocht. De enzymatische vloeistoffen waren dezelfde, die ook voor dit onderzoek hadden dienst gedaan (zie § 4). Voor het onderzoek op pectinase bracht ik in de vloeistof stukjes pectinezuurgel, welke bereid waren uit gelijke deelen van

een 2%-ige citroenpectineoplossing en een klaverpectaseoplossing. Indien pectinase aanwezig was, trad versmelting van het gel op. De resultaten van deze proefnemingen zijn in tabel XV weergegeven.

TABEL XV.

Onderzoek naar de pectinase-afscheiding door verschillende fungi.

Gebruikte fungus:	Versmelting van pectinezuur door het uit den fungus bereide enzyme
<i>Rhizopus Oryzae</i> Went et Prinsen Geerlig	1
„ <i>nigricans</i> Ehrenberg	5
„ <i>Tritici</i> Saito	3
<i>Sclerotinia Libertiana</i> Fuckel	3
„ <i>cinerea</i> Bon. No. 250	0
„ „ „ No. 209	0
„ „ „ No. 220	0
„ „ „ No. 190	0

In alle gevallen, waarin versmelting van het gel optrad, was die na eenigen tijd volledig. De in de tabel opgenomen cijfers geven een maat voor de snelheid van dit proces, waarbij dan o aangeeft, dat versmelting geheel achterwege bleef.

De interpretatie van deze proefnemingen eischt groote voorzichtigheid. Eenerzijds toch laat het feit, dat alle genoemde schimmelsoorten in een voedingsmedium waren gecultiveerd, waarin citroenpectine als eenig koolstofvoedsel aanwezig was, nauwelijks twijfel, of alle fungi beschikken over het vermogen om pectine respectievelijk pectinezuur te hydrolyseren. Wij zullen dus de verkregen resultaten wel zoo moeten opvatten, dat de vier eerstgenoemde schimmels wel, doch *Sclerotinia cinerea* geen pectinase aan het omringende medium afstaat. Deze zienswijze wordt nog versterkt door het feit, dat DAVISON en WILLAMAN wel pectinase in de laatstgenoemde schimmelsoort konden vaststellen, welke tegenstrijdigheid haar

oorzaak zal vinden in het feit, dat deze onderzoekers werkten met een extract van het fijngewreven schimmelmycelium.

Opgemerkt zij nog, dat in die gevallen, waarin het pectinezuurgel was verdwenen, in de vloeistof door alcoholtoevoeging geen neerslag meer ontstond, wat dus bewijst, dat wij hier niet met een enkel fysieke toestandsverandering te doen hebben. Voorts zij hieraan toegevoegd, dat de onderzochte enzymvloeistoffen, welke een zuurgraad overeenkomende met een $pH = 5$ hadden, na opkoking alle geheel zonder eenige werking op het gel waren.

De verkregen resultaten laten, alles bijeengenomen, geen twijfel, dat de bestudeerde fungi bij groei in een plantenweefsel niet slechts zullen volstaan met een afsplitsing van pectine uit de protopectine van de tusschenlamel, doch tevens de pectine in hare bouwsteen zullen ontleden, welke bouwsteen dan ongetwijfeld mede als voedingssubstraat zullen dienst doen.

Ik ging verder nog na, of ik micro-organismen zou kunnen vinden, die in staat waren pectinezuur onder anaërobe voorwaarden aan te tasten en zoo ja, of hieruit dan eveneens een pectinasepreparaat zou kunnen worden bereid. Hiertoe bereidde ik een pectinezuurgel door eene 2%-ige oplossing van pectine met eene oplossing van wortelpectase te coaguleeren, waarna ik de in de pectase oplossing resp. de in de pectine-oplossing aanwezige oplosbare verontreinigingen door voortgezet uitwasschen met gedestilleerd water verwijderde. Het aldus gezuiverde gel werd nu in een wijmondsstopfleschje gebracht, dat verder met water geheel werd aangevuld, terwijl zoodanige hoeveelheden NH_4Cl en K_2HPO_4 werden toegevoegd, dat de concentratie van deze stoffen 0,1% werd. Voorts werd nog 3% fijn verdeeld krijt toegevoegd. Het fleschje werd vervolgens met tuingrond geënt en goed gesloten bij $35^\circ C.$ geplaatst. De massa was reeds na twee dagen geheel vervloeid en vertoonde eene krachtige gisting. De na filtratie verkregen vloeistof werd met een overmaat chloroform behandeld. Indien men hierin een stukje pectinezuurgel bracht, vervloeide dit binnen zeer korten tijd, terwijl het gel niet versmolt, indien de vloeistof te voren was opgekookt. Op grond hiervan mag dus tot de aanwezigheid van pectinase in de uit de „ruwcultuur” bereide enzymoplossing worden besloten. Een zelfde uitkomst verkreeg ik met het ook voor het protopectinase-onderzoek gebruikte enzymextract, dat uit de, bij de ophoofingsproef met aardappelen verkregen bacteriëncultuur was bereid.

Tenslotte zij nog melding gemaakt van het feit, dat noch het uit de wortelen van *Daucus Carota* L. verkregen sap, noch het in de vorige paragraaf vermelde mispelenzyme ook maar de geringste pectinasewerking vertoonde: het in deze vloeistof gebrachte pectinezuurgel onderging geenerlei verandering.

§ 8. Samenvattend overzicht van het voorkomen der pectine-enzymen in de door mij onderzochte materialen.

Ik meen goed te doen, hieronder het resultaat van de in hoofdstuk VII en de in de vorige paragrafen van dit Hoofdstuk, beschreven proefnemingen naar het voorkomen der drie pectine-enzymen hier kort samen te vatten. Tabel XVI geeft hiervan een overzicht.

TABEL XVI.

Overzicht van het voorkomen van protopectinase, pectase en pectinase in verschillende materialen.

Aanduiding van het materiaal	Proto-pectinase	Pectase	Pectinase
Ophooping <i>Clostridium</i> sp.	+	+	+
„ anaërobe pectinezuur-aantastende bact.	+	+	+
<i>Rhizopus Oryzae</i> Went et Prinsen Geerlig's....	+	+	+
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg	+	+	+
<i>Rhizopus Tritici</i> Saito	+	+	+
<i>Sclerotinia Libertiana</i> Fuckel	+	+	+
<i>Sclerotinia cinerea</i> Bon	—	+	+ ¹⁾
Vrucht van <i>Mespilus germanica</i> L.....	+	+	—
Wortel van <i>Daucus Carota</i> L.	—	+	—
Bladeren van <i>Trifolium pratense</i> L.	—	+	—
Extr.v.gekiemdegerstkorrels(<i>Hordeumsativum</i> L.)	—	+	—

Aangaande deze tabel dient in de eerste plaats te worden opgemerkt, dat de positieve aanwijzingen voor pectase in die gevallen, waarin tevens pectinase voorkomt, slechts berusten op het feit,

¹⁾ Niet rechtstreeks aangetoond, berust op indirecte evidentie. Vergelijk § 7.

dat methylalcoholafsplitsing uit pectine plaats vindt. In hoeverre deze afsplitsing werkelijk aan het voorkomen eener afzonderlijke pectase moet worden toegeschreven, dan wel op rekening der pectinase moet worden gesteld, moet hier in het midden gelaten worden.

Voorts blijkt uit deze samenvatting nog eens duidelijk, dat inderdaad tot het bestaan van drie afzonderlijke de pectinestoffen aantastende enzymen moet worden geconcludeerd. Belangrijk is vooral het gezichtspunt, dat de aanwezigheid van een protopectine-aantastend enzyme geenszins behoeft in te sluiten, dat tevens ook het vermogen aanwezig is, om pectine verder dan tot pectinezuur af te breken. Maar daarnaast leeren wij, dat dit laatste vermogen geenszins altijd gepaard gaat met een vermogen tot aantasting van protopectine, hoewel de protopectinase — zooals het voorbeeld van de mispelvrucht leert — ook bij afwezigheid van een pectinezuur-aantastend vermogen kan voorkomen. De pectase is dus het eenige der drie enzymen, dat door mij afzonderlijk is aangetroffen.

SAMENVATTING DER RESULTATEN.

De uitgebreide doch zeer verspreide en weinig overzichtelijke literatuur over de pectinestoffen is aan een kritische bespreking onderworpen. Voor zoover deze literatuur betrekking had op de chemie dier verbindingen werd na een nauwkeurige toetsing der beschikbare gegevens overgegaan tot het opstellen van een „sleutel”, welke het mogelijk maakt de door vroegere onderzoekers onder zeer uiteenlopende benamingen beschreven pectinestoffen onderling en met de in dit proefschrift gebezigde benamingen te identificeren.

Afzonderlijk werden de vroegere onderzoekingen over de localisatie en wijze van voorkomen van de pectinestoffen in de plant in beschouwing genomen.

De voor het onderzoek der *pectinestoffen* en hare bouwstenen op den voorgrond getreden bepalingmethoden werden beproefd.

Bij toetsing van de in de laatste jaren door andere onderzoekers veelvuldig bij het onderzoek van pectine toegepaste „koolzuur-methode” ter bepaling van de „uronzuur”-bouwstenen dezer stoffen op zuiver bariumgalacturonaat, bleek mij, dat de koolzuur-afsplitsing — in tegenstelling met wat genoemde onderzoekers steeds zonder contrôle hadden aangenomen — geenszins quantitatief verloopt. De bij deze methode verkregen uitkomsten waren evenwel voldoende constant om hierop met behulp van een empirischen factor toch een benaderende bepalingwijze te baseeren.

Uit het wit der citroenschillen werden pectinestoffen van uiteenlopend karakter bereid. In de eerste plaats streefde ik er naar, overeenkomstig het voorschrift van SUCHARIPA, protopectine te bereiden, doch moest constateeren, dat ondanks zorgvuldige inachtneming der door dezen onderzoeker beschreven voorzorgsmaatregelen een product werd verkregen, dat geen veresterden methylalcohol meer bevatte en dat dus zeker niet als de moederstof der pectine mocht worden beschouwd. In aansluiting aan werkwijzen van vroegere onderzoekers werd vervolgens citroenpectine door voorzichtige hydrolyse van het protopectinehoudende weefsel bereid. Uit één dezer preparaten werd de corresponderende zure pectine en vervolgens het pectinezuur bereid. Van deze verschillende pectinestoffen werd een „bouwstenen”-analyse verricht. Van de

eenvoudigste dezer verbindingen, namelijk het pectinezuur, waarvan ook de elementaire samenstelling werd vastgesteld, werden tevens de calcium- en natriumzouten bereid. Het totaal der waarnemingen leidde tot de opvatting, dat daarin waarschijnlijk vier moleculen galacturonzuur en één molecuul pentose anhydrisch gebonden voorkomen.

Na een voorafgaande studie der *pectase*-literatuur werden eenige methoden aangegeven voor het aantoonen van dit enzyme. In het bijzonder werd er op gewezen, dat daarbij met voordeel gebruik kan worden gemaakt van de zure reactie van het gevormde pectinezuur. Voorts werd van de methylalcoholmethode gebruik gemaakt, om het verloop der pectasewerking quantitatief te vervolgen en werd deze methode toegepast om de optimale temperatuur der pectasewerking te benaderen. Eenige waarnemingen werden verricht over de factoren, welke den geleeringstijd van een pectine-pectasemengsel bepalen. Duidelijk bleek hieruit, dat het in het algemeen niet toelaatbaar is dezen geleeringstijd als een maat voor de pectasewerking te gebruiken. Bij eenige proefnemingen over de viscositeitsverandering, welke een pectineoplossing onder den invloed van pectase ondergaat, kon de waarneming van BALL betreffende de vermindering van viscositeit, welke na een aanvankelijke stijging aan de coagulatie zou voorafgaan, niet worden bevestigd. Bij eenige waarnemingen omtrent den invloed van de waterstofionenconcentratie op de pectasewerking werden uitkomsten verkregen, welke de uitspraak van EULER en SVANBERG, dat het optimum dezer werking bij een $\text{PH} = 4,3$ is gelegen, zeer onwaarschijnlijk maken.

De literatuur aangaande de de overige pectinestoffen ontledende enzymen werd samengevat, waarbij op de noodzakelijkheid werd gewezen, scherp te onderscheiden tusschen het enzyme, dat uit de protopectine de oplosbare pectine vrijmaakt en dat *protopectinase* is genoemd en het enzyme, dat pectinezuur en mogelijk ook de pectine in de bouwsteen splitst en dat verder als *pectinase* is aangeduid.

Uit anaërobe bacteriën van het geslacht *Clostridium* werd een protopectinasepraeparaat bereid. Hiervan werd vastgesteld de optimale temperatuur en de optimale zuurgraad.

Ook in verschillende schimmelsoorten werd een protopectinase aangetoond. Het opmerkelijke feit, dat dit niet mogelijk was bij de typisch parasitaire *Sclerotinia cinerea* leidde tot een nadere

beschouwing van de verdere factoren, welke voor het verdwijnen van protopectine in plantenweefsels in aanmerking komen, waarbij bijzondere aandacht werd geschonken aan de als schimmelstofwisselingsproduct veelvuldig aangetroffen oxalaten. Nader onderzoek van deze aangelegenheid leidde tot het vermeldenswaardige resultaat, dat niet alleen oxalaten, maar ook alkalizouten van eenige andere organische zuren een zeer goede oplossing der protopectine van sommige plantenweefsels bewerken. In het bijzonder moge het met vlasstengels verkregen gunstige resultaat hier worden vermeld. Deze uitkomsten zijn het best in overeenstemming te brengen met de opvatting, dat de protopectine in deze weefsels als het ware twee kwetsbare punten bezit. Terwijl de protopectinase waarschijnlijk de binding tusschen het pectinedeel van het molecuul en de hemicellulose of andere celwandstoffen verbreekt, bewerken de genoemde alkalizouten waarschijnlijk een dubbele omzetting, waarbij de natuurlijke aardalkaliprotopectine in een oplosbare alkaliprotopectine overgaat. Hieraan moet evenwel worden toegevoegd, dat de protopectine in sommige andere weefsels ongevoelig is voor de inwerking der genoemde zouten en dus een afwijkende constitutie moet bezitten.

De overweging, dat protopectinase tot dusver in hogere planten nog nauwelijks was aangetroffen leidde tot een met positief resultaat bekroond onderzoek naar de aanwezigheid van dit enzyme in de mispelvrucht in den toestand van „rot”-wording. Een hierop aansluitend onderzoek naar de omzettingen der pectinestoffen bij laatstgenoemd proces deed aan het licht komen, dat deze omzettingen in hoofdzaak zijn terug te voeren op een aangrijpen der protopectine door protopectinase en een daarop volgende omzetting van de gevormde pectine in pectinezuur onder invloed eener pectase.

Voorts werden nog eenige waarnemingen verricht over de aanwezigheid van *pectinase* in verschillende materialen. Dit enzyme kon in een aantal schimmelsoorten en ook in enzymextracten van bacterieele herkomst worden aangetoond.

De verkregen gegevens over de verspreiding der drie pectineontledende enzymen in de door mij onderzochte materialen werden samengevat. Het daarbij verkregen resultaat leverde een nadere aanwijzing ten gunste van de onafhankelijkheid dezer drie enzymen.

STELLINGEN.

1.

Citroenpectine is een mengsel van pectinestoffen, waarvan de carboxylgroepen in wisselende verhouding deels met calcium en magnesium zijn verzadigd, deels met methylalcohol zijn veresterd; de waarschijnlijkste voorstelling aangaande de constitutie van de in laatstgenoemd opzicht hoogstwaardige verbinding is, dat deze stof een tetramethylester van een anhydro-monoarabinose-tetragalacturonzuur is.

2.

De pectase behoort niet, zooals gewoonlijk wordt aangenomen, tot de groep der carbohydrasen, doch tot de groep der esterasen.

3.

Hoewel de juistheid der vrij talrijke in de literatuur voorkomende opgaven omtrent het reproductievermogen van cellen met verhoude wanden door het recente onderzoek van MARIA JAEGER hoogst twijfelachtig is geworden, neemt dit niet weg, dat tijdens de ontwikkeling van bepaalde cellen eenmaal in den celwand afgezette houtstof wederom kan verdwijnen.

M. JAEGER, Jahrb. f. wissensch. Botanik 68, pag. 345, (1928).

4.

Ten onrechte beweert CARBONE, dat de cultures van de door vroegere onderzoekers, zooals BEIJERINCK en VAN DELDEN, beschreven anaërobe pectine-aantastende bacteriën geïnfecteerd waren met *Bac. felsineus*.

D. CARBONE, Faserforschung 2, pag. 172, (1922).

5.

Het door RIPPEL gegeven reactie-schema voor de oxydatie van glucose onder den invloed van *Aspergillus niger*, moet onwaarschijnlijk worden geacht.

A. RIPPEL, Vorlesungen über theoretische Mikrobiologie, pag. 105, (1927).

6.

De uitspraak van BERGIUS, dat lignine ontstaat uit twee moleculen hexose onder toetreding van één molecule zuurstof, is onhoudbaar.

F. BERGIUS, Die Naturwissenschaften 16, pag. 9, (1928).

7.

De incrusteerende bestanddeelen van den plantaardigen celwand (pectine, lignine, enz.) komen daarin in hoofdzaak intermicellair voor.

8.

Bij kolloïdchemische onderzoekingen over de gelatineering van het agarsol, dient meer aandacht aan den tijdfactor te worden geschonken.

E. IWASE, Kolloïd-Zeitschrift 43, pag. 70, (1927).

9.

Voor bepalingen van ijzer in den ferrivorm is in vele gevallen de oxydimetrische titratie na voorafgaande behandeling met JONES' reductor zeer aan te bevelen.

Verg. W. L. BURDICK, Journ. Am. Chem. Soc. 48, pag. 1179, (1926).

10.

Bij de electrochemische analyse verdient in vele gevallen het gebruik van Wood's metaal als kathode boven dat van kwik de voorkeur.

H. PAWECK und R. WEINER, Zeitschr. f. anal. Chem. 72, pag. 225, (1927).

11.

Het gebruik van kwikoxyde als oertiterstof bij de alkalimetrie verdient aanbeveling.

Zeitschr. f. anal. Chem. 56, pag. 177, (1917).

12.

Bij de bepaling van chroom als chromioxyde is het overbodig om, zooals TREADWELL aangeeft, dit oxyde in een waterstofstroom te gloeien.

F. P. TREADWELL, Lehrb. der Anal. Chem. Bd. II, pag. 87, (1921).

13.

Kunstmatige droging van hout verdient hier te lande meer aandacht; vacuum-droogsystemen bieden hierbij in commercieel op-

zicht geen voordeelen boven die, welke op een rationeele circulatie van onvolledig gedroogde lucht berusten.

14.

Sinds de invoering van het diffusiesysteem hebben de pectine-stoffen hare beteekenis voor de bietsuikerindustrie verloren.

15.

Het jam-limonadebesluit diende, wat betreft de bepalingen handelende over de bereiding van jams, te worden aangevuld met voorschriften, welke de in vele gevallen onmisbare toevoeging van pectinepraeparaten regelen.

16.

De heden ten dage nog voorkomende usance om handelswaaren te verkoopen op analyses, verricht volgens niet openbaar gemaakte methoden, verdient ernstige afkeuring.
