

**Untersuchung der intestinalen Fermentationskinetik
strukturell unterschiedlicher Pektine unter
in vitro und *in vivo* Bedingungen**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Caroline Bender

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

2. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 2023

**ES GIBT DINGE, DIE MAN NICHT GEMEINSAM ERLEBEN KANN, OHNE DASS
MAN FREUNDSCHAFT SCHLIESST.**

- AUS HARRY POTTER UND DER STEIN DER WEISEN

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, den 20. Juni .2023

Caroline Bender

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	DIE PFLANZLICHE ZELLWAND.....	2
1.1.1.	Aufbau der pflanzlichen Zellwand.....	2
1.1.2.	Strukturen von Zellwandpolysacchariden.....	3
1.1.2.1.	Cellulose.....	4
1.1.2.2.	Xyloglucane.....	4
1.1.2.3.	Xylane.....	5
1.1.2.4.	Mannane.....	5
1.1.3.	Struktur von Pektinen.....	6
1.1.3.1.	Homogalacturonane.....	7
1.1.3.2.	Typ I Rhamnogalacturonane.....	8
1.1.3.2.1.	Arabinane.....	8
1.1.3.2.2.	Typ I (Arabino-)Galactane.....	9
1.1.3.2.3.	Typ II (Arabino-)Galactane.....	9
1.1.3.2.4.	Substituierte Strukturen: Hydroxycimtsäuren.....	10
1.1.3.3.	Typ II Rhamnogalacturonane.....	10
1.1.3.4.	Xylogalacturonane.....	11
1.1.3.5.	Modelle zur makromolekularen Struktur von Pektinen.....	11
1.2.	EXTRAKTION VON PEKTINEN.....	12
1.3.	EIGENSCHAFTEN VON PEKTINEN.....	15
1.3.1.	Technofunktionelle Eigenschaften.....	15
1.3.2.	Ernährungsphysiologische Eigenschaften.....	16
1.4.	FERMENTATION VON PEKTINEN.....	16
1.4.1.	Bildung intermediärer Spaltungsprodukte.....	16
1.4.2.	Bildung von kurzkettigen Fettsäuren.....	18
1.4.3.	Beeinflussung der Darmmikrobiota.....	20
2.	ZIELSETZUNG	23
3.	MATERIAL UND METHODEN	25

3.1.	BESCHREIBUNG DER KOMMERZIELLEN PEKTINE	25
3.2.	LABORTECHNISCHE EXTRAKTION DER PEKTINE	25
3.2.1.	Ausgangsmaterialien	25
3.2.2.	Optimierung der Extraktionsparameter	26
3.3.	STRUKTURCHARAKTERISIERUNG DER PEKTINE	26
3.3.1.	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	26
3.3.2.	Bestimmung der Bindungsverhältnisse in den Polysacchariden.....	29
3.3.3.	Bestimmung des Methylierungs- und Acetylierungsgrads der polymergebundenen Galacturonsäure.....	32
3.3.4.	Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung und des Molekulargewichts	35
3.3.5.	Bestimmung des Anteils an Nicht-Pektinkomponenten.....	37
3.4.	FERMENTATIONSVERSUCHE	39
3.4.1.	Enzymatische Fermentation	39
3.4.2.	<i>In vitro</i> Fermentation mit humaner Fäzes.....	41
3.4.3.	Murine <i>in vivo</i> Fermentationsstudie	42
3.4.4.	Humane <i>in vivo</i> Fermentationsstudie	45
3.5.	AUFARBEITUNG DER PROBEN NACH FERMENTATION	46
3.6.	CHARAKTERISIERUNG FREIGESETZTER OLIGOSACCHARIDE	48
3.6.1.	NMR-spektroskopische Verfahren.....	48
3.6.2.	HPLC-MS-basierte Verfahren	49
3.6.3.	Isolierung freigesetzter Oligosaccharide	53
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4.1.	OPTIMIERUNG DER PARAMETER ZUR PEKTINEXTRAKTION	55
4.1.1.	Grundparameter der Pektinextraktion.....	55
4.1.2.	Enzymatische Unterstützung der Pektinextraktion.....	60
4.1.3.	Aufreinigung der Pektine	62
4.2.	STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DER PEKTINE	65
4.3.	ENZYMATISCHE FERMENTATION	73

4.3.1. Betrachtung des Fermentationsverlaufs und der freigesetzten Oligosaccharide durch Driselase	74
4.3.2. Betrachtung des Fermentationsverlaufs und der freigesetzten Oligosaccharide durch Viscozyme L.....	76
4.4. <i>IN VITRO</i> FERMENTATION DER PEKTINE MIT HUMANEN FÄZES	78
4.4.1. Analyse der nicht fermentierten Polysaccharide	78
4.4.1.1. Gravimetrische Bestimmung	78
4.4.1.2. Veränderungen in der Molekulargewichtsverteilung.....	80
4.4.1.3. Veränderungen in der Feinstruktur.....	84
4.4.2. Identifizierung von mono-, di- und oligomeren Spaltprodukten.....	89
4.5. MURINE <i>IN VIVO</i> FERMENTATION DER PEKTINE	98
4.5.1. Analyse der nicht fermentierten Polysaccharide	98
4.5.2. Identifizierung nicht fermentierter Mono-, Di- und Oligosaccharide	105
4.6. HUMANE <i>IN VIVO</i> FERMENTATION DER PEKTINE	109
4.6.1. Analyse der nicht fermentierten Polysaccharide	109
4.6.2. Identifizierung nicht fermentierter Mono-, Di- und Oligosaccharide	112
4.7. ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION	113
5. ZUSAMMENFASSUNG	121
6. LITERATURVERZEICHNIS	125
7. CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE	149
7.1. CHEMIKALIEN	149
7.2. ENZYME	153
7.3. PUFFER UND REAGENZIEN.....	154
7.4. INSTRUMENTE.....	156
7.4.1. Verwendete Säulen.....	156
7.4.2. Analysengeräte.....	157
8. ARBEITSVORSCHRIFTEN	159
8.1. EXTRAKTION DER PEKTINE	159
8.2. STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DER PEKTINE	161

8.2.1.	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	161
8.2.2.	Methylierungsanalyse.....	163
8.2.3.	Enzymatisches Profiling der Arabinane und Galactane	164
8.2.4.	Bestimmung des Methylierungs- und Acetylierungsgrades der polymergebundenen Galacturonsäuren	166
8.2.5.	Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung und des gewichtsgemittelten Molekulargewichts	167
8.2.6.	Bestimmung des Aschegehalts	167
8.2.7.	Bestimmung des Proteingehalts.....	168
8.3.	ENZYMATISCHE FERMENTATION	168
8.4.	AUFARBEITUNG DER PROBEN NACH FERMENTATION	169
8.4.1.	<i>In vitro</i> Fermentation der Pektine.....	169
8.4.2.	<i>In vivo</i> Fermentation der Pektine im murinen Modell.....	169
8.4.3.	<i>In vivo</i> Fermentation der Pektine im humanen Modell.....	170
8.5.	CHARAKTERISIERUNG FREIGESETZTER MONO-, DI- UND OLIGOSACCHARIDE ...	171
8.5.1.	Analyse mittels HPAEC-PAD/MS	171
8.5.2.	Analyse mittels UHPLC-MS ²	172
8.5.3.	Präparative Isolierung der Mono-, Di- und Oligosaccharide.....	173
8.5.4.	NMR-Spektroskopische Analyse der präparativ isolierten Strukturen	173
9.	ANHANG	175
9.1.	ABBILDUNGEN	175
9.2.	TABELLEN.....	187
10.	PUBLIKATIONSLISTE	217

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	Zweidimensional
AP	Kommerzielles Apfelpektin
AP-L	Labortechnisches Apfelpektin
BCFA	Englisch: <i>Branched-Chain Fatty Acids</i>
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
CAZymes	Englisch: <i>Carbohydrate-Active Enzymes</i> , kohlenhydrataktive Enzyme
CD	Englisch: <i>Conductivity Detector</i> , Leitfähigkeitsdetektor
CID	Englisch: <i>Collision-Induced Dissociation</i> , Kollisionsinduzierte Dissoziation
CoA	Coenzym A
CP	Kommerzielles Citruspektin
CP-L	Labortechnisches Citruspektin
δ	Chemische Verschiebung
DAc	Englisch: <i>Degree of Acetylation</i> , Acetylierungsgrad
DAD	Diodenarraydetektor
dn/dc	Brechungsindexinkrement
DM	Englisch: <i>Degree of Methylation</i> , Methylierungsgrad
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Englisch: <i>Degree of Polymerization</i> , Polymerisationsgrad
EFSA	Englisch: <i>European Food Safety Authority</i>
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
f	Furanose
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie

HCD	Englisch: <i>Higher-Energy Collisional Dissociation</i>
HILIC	Englisch: <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> , Hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	Englisch: <i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPAEC	Englisch: <i>High Performance Anion Exchange Chromatography</i> , Hochleistungsanionenaustauschchromatographie
HPSEC	Englisch: <i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i> , HochleistungsgröBenausschlusschromatographie
HRMS	Englisch: <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> , Hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	Englisch: <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
MALS	Englisch: <i>Multi Angle Light Scattering</i> , Mehrwinkellichtstreuung
M_n	Zahlengemitteltes Molekulargewicht
M_η	Viskositätsgemitteltes Molekulargewicht
$MS^{(n)}$	(mehrdimensionale) Massenspektrometrie
M_w	Gewichtsgemitteltes Molekulargewicht
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NADH/NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	Englisch: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernspinresonanz
p	Pyranose
PAD	Englisch: <i>Pulsed Amperometric Detection</i> , gepulst amperometrische Detektion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGC	Englisch: <i>Porous Graphitized Carbon</i>
PMAA	Partiell methylierte Alditolacetate

PUL	Englisch: <i>Polysaccharide-Utilization Loci</i>
SBP	Kommerzielles Zuckerrübenpektin
SCFA	Englisch: <i>Short-Chain Fatty Acids</i> , Kurzkettige Fettsäuren
SIM	Englisch: <i>Single Ion Monitoring</i>
SPME	Festphasenmikroextraktion
Sus	<i>Starch-Utilization System</i>
TFA	Englisch: <i>Trifluoroacetic Acid</i> , Trifluoressigsäure
TIC	Englisch: <i>Total Ion Current</i>
UV	Ultraviolett

1. EINLEITUNG

Der Verzehr von Obst, Gemüse und getreidebasierten (Vollkorn-)Produkten ist ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung, was durch die lebensmittelbezogene Ernährungsempfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) bekräftigt wird. Dementsprechend soll die tägliche Energiezufuhr eines Menschen überwiegend auf pflanzlichen Lebensmitteln basieren (DGE 2016). Als Grundlage für die Relevanz pflanzlich basierter Lebensmittel in der menschlichen Ernährung ist insbesondere deren Rolle als Quelle für die heterogene Gruppe der Ballaststoffpolysaccharide aus der pflanzlichen Zellwand zu nennen. So wurden für Ballaststoffe verschiedene Empfehlungen für eine tägliche Zufuhr ausgesprochen; während die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) eine tägliche Menge von 25 g Ballaststoffen empfiehlt, rät die DGE eine Aufnahmemenge von 30 g Ballaststoffen am Tag an (EFSA 2010; DGE 2021). Als mengenmäßig bedeutende Heteropolysaccharide in dikotylen Pflanzenzellwänden tragen Pektine einen wesentlichen Anteil zu der täglichen Ballaststoffzufuhr bei. Die Relevanz für die Humanernährung wird zusätzlich dadurch erhöht, dass Pektine aufgrund ihrer mannigfaltigen technofunktionellen Eigenschaften, wie unter anderem ihren hervorragenden Gelbildungseigenschaften, bereits seit vielen Jahrzehnten verschiedenen Lebensmitteln zugesetzt werden. Neben den funktionellen Eigenschaften der Pektine sind insbesondere deren ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften für die menschliche Ernährung relevant. Dabei sind bereits gesundheitsbezogene Aussagen (*Health Claims*) zur Aufrechterhaltung eines normalen Cholesterinspiegels im Blut sowie zu einem geringeren Anstieg des Blutglucosespiegels nach der Nahrungsaufnahme mit einer täglichen Pektinaufnahme von 6 g bzw. einer Pekinzufuhr von 10 g pro Mahlzeit etabliert. Zusätzlich werden weitere ernährungsphysiologisch positive Eigenschaften auf Grundlage von *in vitro* und *in vivo* Studien diskutiert. Viele dieser Effekte beruhen darauf, dass Pektine im Magen und Dünndarm von Menschen nicht oder nur zu geringen Anteilen umgesetzt werden und so (nahezu) unverdaut in den Dickdarm gelangen. Dort werden sie von bakteriellen Enzymen über intermediäre Spaltprodukte zu kurzkettigen Fettsäuren (*Short-Chain Fatty Acids*, SCFA) und weiteren Fermentationsendprodukten umgesetzt. Als Hauptprodukte der intestinalen Pektinfermentation werden Acetat, Propionat und Butyrat gebildet. Zu deren Bildung und quantitativen Verteilung gibt es in der wissenschaftlichen Literatur bereits zahlreiche Studien. Auch die Beeinflussung der Quantität, Diversität und Zusammensetzung der intestinalen Bakterien durch die Fermentation von Pektinen wurde bereits in ihren Grundzügen untersucht. Darüber hinaus ist zumindest teilweise bekannt, inwiefern die Bildung der SCFA und die Zusammensetzung der humanen Mikrobiota durch strukturell unterschiedliche Pektine und deren Struktureinheiten beeinflusst werden. Allerdings ist, bedingt durch die strukturelle Heterogenität von Pektinen und die damit einhergehenden komplexen Fermentationsvorgänge, wenig über die

1. Einleitung

intestinale Fermentationskinetik unterschiedlicher Strukturelemente von Pektinen bekannt. Dieses Wissen ist jedoch unerlässlich, um Rückschlüsse auf die gegebenenfalls verschiedenen gesundheitlichen Aspekte strukturell unterschiedlicher Pektinstruktureinheiten bzw. Pektine ziehen zu können.

1.1. DIE PFLANZLICHE ZELLWAND

Die pflanzliche Zellwand erfüllt viele essentielle Funktionen, welche unter anderem die Physiologie und Integrität von Pflanzen sichern. Im Vordergrund stehen dabei die Stabilität der Zelle, welche die Standhaltung des Turgordrucks ermöglicht, sowie deren Schutz vor äußeren biotischen und abiotischen Faktoren. Neben der Regulierung des Zellwachstums und der Möglichkeit zur Differenzierung verschiedener Pflanzengewebe ist die pflanzliche Zellwand ebenso relevant für die interzelluläre Kommunikation und einen gezielten Stoffaustausch (Carpita und Gibeaut 1993; McDougall *et al.* 1996; Caffall und Mohnen 2009).

Diese unterschiedlichen Funktionen der pflanzlichen Zellwand werden unter anderem durch ein komplexes System aus einer Vielzahl unterschiedlicher Polysaccharide, Strukturproteine und Polyphenole ermöglicht. Die dabei ausgebildeten heterogenen Strukturen und Netzwerke können zwischen unterschiedlichen Pflanzen stark variieren und werden unter anderem von der Art der Pflanze, dem Gewebe, dem Zelltyp sowie dem Reifegrad beeinflusst. Durch die Gesamtheit der unterschiedlichen Faktoren und Einflüsse entsteht ein sich konstant veränderndes System (Caffall und Mohnen 2009).

1.1.1. Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Die pflanzliche Zellwand ist meist aus bis zu drei miteinander interagierenden, jedoch strukturell unterschiedlichen Schichten aufgebaut; der Mittellamelle, der Primärzellwand und der Sekundärzellwand (McDougall *et al.* 1996). Die Mittellamelle wird während der Zellteilung gebildet und ist in den Zellzwischenräumen lokalisiert, wo sie unter anderem für die Adhäsion zwischen den Zellen verantwortlich ist. Strukturell ist die Mittellamelle hauptsächlich aus Pektinen aufgebaut, welche durch enzymbasierte strukturelle Modifikationen so verändert werden können, dass eine Regulierung der Zell-Zell-Adhäsion ermöglicht wird (Daher und Braybrook 2015). Der Mittellamelle ist die Primärzellwand aufgelagert, welche aus Cellulosemikrofibrillen besteht, die in einer Matrix aus Pektinen, Hemicellulosen, Proteinen und phenolischen Verbindungen eingebettet sind. Der Aufbau der Primärzellwand variiert zwischen unterschiedlichen Pflanzen und kann in zwei Gruppen unterteilt werden. Dikotyle Pflanzen weisen zusammen mit den nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen und den Gymnospermen Primärzellwände des Typs I auf, während commelinide monokotyle Pflanzen durch Typ II Primärzellwände charakterisiert sind (Harris und Smith 2006). Zu den commeliniden Monokotyledonen zählen unter anderem Pflanzen der Familie der Süßgräser (*Poaceae*), welcher beispielsweise die Getreide Mais und Weizen

zugehörig sind. Die meisten als Lebensmittel verzehrten Obst- und Gemüsearten weisen dahingegen Typ I Primärzellwände auf. Strukturell sind Typ I Primärzellwände neben Cellulose (Kapitel 1.1.2.1.) durch einen hohen Anteil an Pektinen (Kapitel 1.1.3.) und Xyloglucanen (Kapitel 1.1.2.2.) gekennzeichnet. Weitere Hemicellulosen wie (Hetero-)Xylane (Kapitel 1.1.2.3.) und (Hetero-)Mannane (Kapitel 1.1.2.4.) sind in deutlich geringeren Mengen vertreten. Primärzellwände des Typs II weisen neben Cellulose überwiegend (Glucuronoarabino-)Xylane und nur geringe Mengen anderer Polysaccharide auf (Vogel 2008). In dieser Arbeit werden mit Apfeltrester, Citruschalen und Zuckerrübenschnitzeln ausschließlich Nebenströme dikotyler Pflanzen als Ausgangsmaterialien zur Pektinextraktion verwendet. Daher werden in den Kapiteln 1.1.2. und 1.1.3. lediglich die Zellwandpolysaccharide der Typ I Primärzellwand näher beschrieben.

Sobald die Zelle ihr Wachstum abgeschlossen hat, kann die Sekundärzellwand, welche wiederum aus einem Netzwerk aus Cellulose und Xylanen aufgebaut ist, aufgelagert werden. Aufgrund von unter anderem der Funktionen und der Biosynthese wird vermutet, dass auch Pektine einen Einfluss auf die Funktionalität und Struktur von Sekundärzellwänden haben (Mohnen 2008). Zusätzlich beginnt mit der Bildung der Sekundärzellwand die Lignifizierung der Zellwand. Das polyphenolische Makromolekül führt zu einer Verholzung der Zellwand und sorgt damit unter anderem für zusätzliche Festigkeit sowie Wasserundurchlässigkeit. Als weitere phenolische Verbindung kann Suberin in der sekundären Pflanzenzellwand von Zellen spezialisierter Gewebe auftreten. Dieses erhöht die Hydrophobizität der Zellwand und schützt darin enthaltene Polysaccharide vor deren Abbau (Harris und Smith 2006).

Neben Polysacchariden und phenolischen Verbindungen haben Proteine eine wichtige strukturgebende Funktion in pflanzlichen Zellwänden. Zu den am häufigsten vertretenen Proteinklassen zählen dabei Extensine (hydroxyprolinreichen Glykoproteine), Arabinogalactanproteine sowie prolinreiche und glycinreiche Proteine (Showalter 1993).

1.1.2. Strukturen von Zellwandpolysacchariden

Die Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand sind weitgehend aus 10 unterschiedlichen Monomereinheiten aufgebaut. Diese können als Pyranose (*p*) und/oder Furanose (*f*) in unterschiedlichen Ringformen sowie in ihrer α - oder β -Konformation vorliegen. Zusätzlich wird die Varianz der Monomereinheiten durch das Auftreten von Enantiomeren in der D- und L-Konfiguration erhöht. Die Vielzahl an Hydroxygruppen ermöglicht die Ausbildung unterschiedlicher glykosidischer Bindungen, was zusätzlich zu der Bildung komplexer Polysaccharide beiträgt. Dennoch liegen die verschiedenen Monosaccharide in den Strukturen der pflanzlichen Zellwand meist in bevorzugten Formen vor, welche in Abbildung 1 dargestellt sind (McDougall *et al.* 1996).

1. Einleitung

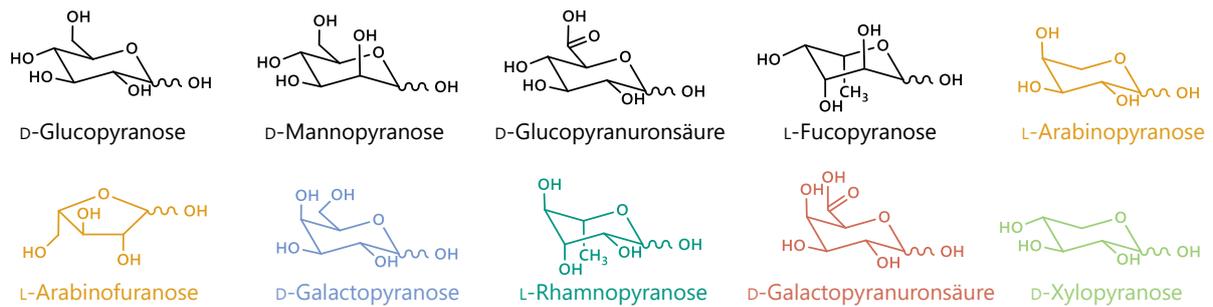


Abbildung 1: Strukturen der bedeutendsten Monosaccharide für die pflanzliche Zellwand. Die für Pektinstrukturen relevanten Monosaccharide sind farbig dargestellt

1.1.2.1. Cellulose

Cellulose ist ein unverzweigtes Homopolysaccharid, welches aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten aufgebaut ist. Diese liegen alternierend um 180 ° gedreht vor und bilden so die sich wiederholende Grundeinheit Cellobiose. In ihrer nativen Form weist Cellulose mit Ketten von bis zu 15000 Monomereinheiten einen hohen Polymerisationsgrad (*Degree of Polymerization*, DP) auf. Über die Hydroxygruppen und Ringsauerstoffatome der Glucoseeinheiten dieser Celluloseketten kommt es zu der Ausbildung einer Vielzahl an intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Mit dem Zusammenschluss von bis zu 100 Cellulosesträngen werden so wasserunlösliche Mikrofibrillen ausgebildet (McDougall *et al.* 1996). Diese sind grundlegend für das Gerüst und somit für die Widerstandsfähigkeit der pflanzlichen Zellwand und können unterschiedlich angeordnet vorliegen. So treten sie in der Sekundärzellwand hauptsächlich in verschiedenen polymorphen Formen als hochgeordnete kristalline Cellulose auf, während sie in der Primärzellwand auch in ihrer amorphen Form vorliegen können (O'Sullivan 1997). Um die Stabilität der Zellwand auch während des Zellwachstums zu gewährleisten, wird unter anderem ein Netzwerk aus Cellulosemikrofibrillen mit weiteren Zellwandpolysacchariden, den Hemicellulosen, ausgebildet. Zusätzlich wird eine Quervernetzung mit Pektinen vermutet (Carpita und Gibeaut 1993).

1.1.2.2. Xyloglucane

In dikotylen und nicht-commeliniden Pflanzen sind Xyloglucane mit einem stark variablen Anteil die mengenmäßig am stärksten in der Primärzellwand vertretenen Hemicellulosen (McNeil *et al.* 1984). Ihre Bindung an Cellulose kann vielfältig erfolgen; neben dem Einschluss von Xyloglucanen in die Cellulosemikrofibrillen im Anschluss an deren Synthese sind Wasserstoffbrücken sowie weitere nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Xyloglucanen und Cellulose relevant für die Ausbildung des Netzwerks. So liegen neben wasserunlöslichen auch solubilisierbare Xyloglucane vor, was eine enzymatische Zugänglichkeit und Modifikation ermöglicht. Über daraus resultierende, strukturellen Veränderungen ist vermutlich eine weitere Regulation der Flexibilität

und Stabilität der Primärzellwand möglich (Pauly *et al.* 1999). Zusätzlich sind Xyloglucane in der pflanzlichen Zelle eine Quelle für Signalmoleküle (Scheller und Ulvskov 2010).

Strukturell haben Xyloglucane wie Cellulose ein lineares Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten. Bei dikotylen Pflanzen liegen etwa 60 - 75 % dieser Glucoseeinheiten an Position O-6 mit α -D-Xylopyranose substituiert vor, welche wiederum an Position O-2 mit β -D-Galactopyranose oder α -L-Arabinofuranose glykosidisch verknüpft sein können. Zusätzlich ist eine Substitution der Galactoseeinheit an Position O-2 mit α -L-Fucofuranose möglich (Fry 1989). Weitere Seitenketten der Xyloglucane sind bekannt, aber mengenmäßig untergeordnet. Möglich ist dabei unter anderem eine Substitution mit β -L-Arabinofuranoseeinheiten oder eine Doppelsubstitution der Xylose in Position O-2 und O-4 (Schultink *et al.* 2014). Die Galactoseeinheiten der Xyloglucaneseitenketten können zusätzlich an Position O-3, O-4 und/oder O-6 einfach oder doppelt acetyliert vorliegen (Kiefer *et al.* 1989).

Zwischen verschiedenen Pflanzen und Zelltypen können starke Variationen in der Struktur der Xyloglucane auftreten, woraus unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen resultieren. So weisen beispielsweise höhersubstituierte Xyloglucane eine höhere Löslichkeit auf (Scheller und Ulvskov 2010).

1.1.2.3. Xylane

Im Gegensatz zu Xyloglucanen machen Xylane lediglich einen geringen Anteil an den Hemicellulosen in der Primärzellwand dikotyler Pflanzen aus und kommen überwiegend in der Sekundärzellwand vor (Ebringerová 2005). Dort können sie neben der nicht-kovalenten Verknüpfung mit Cellulosemikrofibrillen vermutlich auch kovalente Bindungen mit Lignin in verholztem Gewebe eingehen (Das *et al.* 1981; Kang *et al.* 2019).

Die Gruppe der Xylane zeichnet sich durch ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Xylopyranoseeinheiten aus. Diese können in Position O-3 und im geringeren Ausmaß in Position O-2 mit Acetylgruppen verestert vorliegen, was einen Einfluss auf deren Interaktion mit Cellulose und weiteren Zellwandpolysacchariden hat (Scheller und Ulvskov 2010; Simmons *et al.* 2016). In den Sekundärzellwänden der Dikotyledonen sind Xylane überwiegend als Heteropolysaccharide in Form von Glucuronoxylanen vertreten. Dabei sind die Xyloseeinheiten des Rückgrats teilweise über α -(1 \rightarrow 2)-glykosidische Bindungen mit D-Glucuronsäure- oder 4-O-Methyl-D-Glucuronsäureeinheiten substituiert. Weitere Monosaccharide sind als Substituenten der Xylane bekannt, aber nur in wenigen Pflanzen vertreten. Ähnlich wie bei Xyloglucanen sind viele funktionelle Eigenschaften wie die Löslichkeit der Xylane stark von deren Seitenketten abhängig (Ebringerová und Heinze 2000).

1.1.2.4. Mannane

Mannane sind überwiegend für ihre Funktion als Speicherpolysaccharide in den Endospermzellwänden von Samen bekannt, kommen jedoch auch mit unterschiedlichen Anteilen als

1. Einleitung

strukturegebende Polysaccharide in den Zellwänden dikotyler Pflanzen vor (Ebringerová 2005). Sie können anhand der Struktur ihres Rückgrats in Galacto- und (Galacto-)Glucomannane unterteilt werden. Das Rückgrat der Galactomannane setzt sich dabei aus β -(1→4)-glykosidisch verknüpften D-Mannopyranoseeinheiten zusammen, welche in Position O-6 mit einzelnen Galactoseeinheiten substituiert vorliegen können. Das Ausmaß der Substitution mit Galactose und deren Verteilung innerhalb des Polysaccharids kann zwischen unterschiedlichen Pflanzen stark variieren und blockweise, regelmäßig oder zufällig vorliegen (Ebringerová 2005). Niedrig substituierte Galactomannane zeigen dabei in manchen Pflanzen eine Assoziation mehrerer Mannanstränge und eine Ausbildung von unlöslichen, teilweise kristallinen Strukturen (Kapoor *et al.* 1998). (Galacto-)Glucomannane weisen hingegen ein Rückgrat aus β -(1→4)-glykosidisch verknüpften Mannose- und Glucoseeinheiten in sich nicht wiederholenden Mustern auf. Eine mögliche Substitution mit Galactose erfolgt wiederum in Position O-6 der Mannoseeinheiten. Sowohl Galactomannane als auch (Galacto-)Glucomannane können zusätzlich in den Positionen O-2, O-3 und/oder O-6 acetyliert vorliegen (Moreira und Filho 2008).

1.1.3. Struktur von Pektinen

Pektine sind in jedem Entwicklungsstadium von dikotylen und nicht-commeliniden Pflanzen sowohl in der Mittellamelle als auch in der Primär- und Sekundärzellwand vertreten. Eine wichtige Funktion der Pektine ist dabei unter anderem das Ermöglichen einer dynamischen, sich stetig verändernden Zellwand ohne gleichzeitigen Verlust der Stabilität. Mit den enthaltenen Galacturonsäureeinheiten und dem damit einhergehenden anionischen Ladungszustand im Pektinpolysaccharid wird der Ionentransport und die Permeabilität der Zellwand für Enzyme reguliert. Außerdem sind Pektine ein wichtiger Faktor bei der Wasserhaltekapazität, der Zell-Adhäsion sowie der Quervernetzung von Polysacchariden und Strukturproteinen (Voragen *et al.* 2009). Als enzymatische Abbauprodukte haben Oligosaccharide aus Pektinen eine weitere Funktion unter anderem als Signalmoleküle in Abwehrreaktionen und der Entwicklung der Pflanzen (Branca *et al.* 1988; Davis *et al.* 1986).

Die vielseitigen Funktionen der Pektine sind auf die ausgeprägte Komplexität der heterogenen Pektinstruktur zurückzuführen. So setzen sich Pektine aus unterschiedlichen Struktureinheiten zusammen, welche sich unter anderem je nach Taxonomie, Pflanzengewebe und Entwicklungsstadium in ihrem Aufbau und dem Verhältnis zueinander unterscheiden können (Voragen *et al.* 2009). Bei den quantitativ dominierenden Strukturelementen handelt es sich um Homogalacturonane sowie Typ I Rhamnogalacturonane, deren Rückgrat mit neutralen Seitenketten substituiert vorliegt. Die Seitenketten setzen sich aus Arabinanen sowie Typ I und Typ II (Arabino-)Galactanen zusammen, welche wiederum mit *trans*-Ferulasäure substituiert sein können. Typ II Rhamnogalacturonane sind dahingegen in deutlich geringeren Anteilen in Pektinen vertreten, während Xylogalacturonane lediglich in vereinzelt Arten auftreten.

1.1.3.1. Homogalacturonane

Bei Homogalacturonanen handelt es sich um lineare Homopolymere aus α -(1→4)-glykosidisch verknüpften D-Galactopyranuronsäureeinheiten, deren Carboxygruppe methylverestert vorliegen kann. Die Positionen O-2 und/oder O-3 können zusätzlich acetyliert sein (Voragen *et al.* 2009; Caffall und Mohnen 2009). Bezogen auf die Gesamtheit der Galacturonsäureeinheiten lässt sich über die Stoffmenge der Methyl- bzw. Acetylgruppen ein Methylierungs- (*Degree of Methylation*, DM) bzw. Acetylierungsgrad (*Degree of Acetylation*, DAc) der Pektine bestimmen. Dabei konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzen ausgemacht werden, wobei beispielsweise Apfel- und Citruspektine einen hohen DM aufweisen, während Kartoffel- und Birnenpektine vergleichsweise gering methyliert sind (Voragen *et al.* 1986). Der DAc ist bei Pektinen dikotylter und nicht commelinider Pflanzen meist vergleichsweise gering. Zu den höheracetylierten Pektinen zählen unter anderem Pektine aus Kakaohülsen und Zuckerrüben (Vriesmann und Petkowicz 2013; Bindereif *et al.* 2021; Eichhöfer *et al.* 2023).

Sowohl der DM als auch der DAc haben einen Einfluss auf die Gelbildung von Pektinen. Dabei wirkt sich der DM insbesondere auf den zugrundeliegenden Mechanismus der Gelbildung und somit auch auf die Eigenschaften der Zellwand aus. Bei Homogalacturonanen mit einem geringen Anteil an Methylveresterungen (meist DM < 50 %) können die Carboxygruppen unveresterter Galacturonsäureeinheiten dissoziiert vorliegen. Die negativ geladenen Bereiche können sich so über bivalente Calciumionen nicht-kovalent miteinander verknüpfen. Aus der Komplexbildung resultieren starke Gele, welche mit dem sogenannten „Egg-Box Modell“ beschrieben werden können und eine wichtige Rolle in der Regulierung der Zell-Adhäsion spielen (Thakur *et al.* 1997; Daher und Braybrook 2015). Die Bildung von Gelen bei hoher Methylveresterung der Homogalacturonane ist für die Eigenschaften der pflanzlichen Zellwand weniger relevant und erfolgt im sauren Milieu und unter Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Mono- und Disacchariden. Dabei kommt es zu einer Zusammenlagerung größerer methylveresterter Bereiche, um die Kontaktflächen zwischen den hydrophoben Bereichen und den Wassermolekülen zu minimieren. Dies erfolgt sowohl über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Methylgruppen als auch über Wasserstoffbrückenbindungen. Die Solvatisierung der Mono- und Disaccharide verringert eine Wechselwirkung des Wassers mit den Homogalacturonanen, wodurch sich intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen besser ausbilden und das Gel verstärkt wird (Thakur *et al.* 1997). Die Acetylierung weist dahingegen einen negativen Effekt auf die Gelbildungseigenschaften von Pektinen auf, sodass mit höherem DAc weniger starke Gele ausgebildet werden (Pippen *et al.* 1950). Dies kann unter anderem auf die durch die Acetylgruppen hervorgerufene sterische Hinderung und die damit einhergehende verschlechterte Assoziation der Homogalacturonanketten zurückgeführt werden.

1. Einleitung

1.1.3.2. Typ I Rhamnogalacturonane

Der strukturelle Aufbau der Typ I Rhamnogalacturonane kann in Rückgrat und neutrale Seitenketten untergliedert werden (vgl. Kapitel 1.1.3.). Das Rückgrat setzt sich alternierend aus α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Galacturonsäureeinheiten und α -(1 \rightarrow 2)-glykosidisch verknüpften L-Rhamnopyranoseeinheiten zusammen. In einigen Pflanzen konnte eine Acetylierung der Galacturonsäureeinheiten in Position O-2 und/oder O-3 in isolierten Strukturen der Typ I Rhamnogalacturonane gezeigt werden (Schols und Voragen 1994; Ishii 1997; Ralet *et al.* 2005b). In Okraschotenpektinen wurde zusätzlich Acetylierung in Position O-3 der Rhamnoseeinheiten des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane nachgewiesen (Sengkhampan *et al.* 2009). Eine Veresterung der Galacturonsäure mit Methanol ist unüblich und konnte lediglich in den Pektinen einzelner Pflanzen wie Tabak und Flachs gezeigt werden (Sun *et al.* 1987; Rihouey *et al.* 1995). In Typ I Rhamnogalacturonanen von Zuckerrübenpektinen wurde zusätzlich eine Substitution der Galacturonsäure mit monomeren D-Glucopyranuronsäureeinheiten an Position O-3 nachgewiesen (Renard *et al.* 1999).

Die Strukturen der Typ I Rhamnogalacturonane zeichnen sich außerdem durch neutrale Seitenketten aus, welche über Position O-4 der Rhamnoseeinheiten glykosidisch gebunden vorliegen. Mögliche Substituenten der Typ I Rhamnogalacturonane sind dabei Arabinane und Typ I sowie Typ II (Arabino-)Galactane. Abhängig von dem Ursprung der Pektine kann der Anteil an substituierten Rhamnoseeinheiten stark variieren und liegt meist zwischen 20 und 90 % (Kaczmarek *et al.* 2022). Anteile und Strukturcharakteristika der neutralen Seitenketten unterscheiden sich nicht nur innerhalb verschiedener Arten der Dikotyledonen, sondern auch zwischen unterschiedlichen Pflanzengeweben und Reifestadien (Lerouge *et al.* 1993; Willats *et al.* 2001; Wefers *et al.* 2018).

1.1.3.2.1. Arabinane

Arabinane sind aus einem Rückgrat aus α -(1 \rightarrow 5)-glykosidisch verknüpften L-Arabinofuranoseeinheiten aufgebaut, welche an Position O-2 und/oder O-3 mit weiteren Arabinofuranosen substituiert vorliegen können. Neben monomeren Arabinoseeinheiten können dabei auch kurze α -(1 \rightarrow 3)-glykosidisch verknüpfte Ketten auftreten (Yapo 2011b). Insgesamt weisen Arabinane eine heterogene Struktur auf. So konnten für Zuckerrübenpektine lange Arabinanketten mit monomeren Arabinoseeinheiten als Substituenten nachgewiesen werden (Oosterveld *et al.* 2002). Die Verzweigung war dabei bevorzugt in Position O-3 (Guillon und Thibault 1989). In späteren Studien konnte zusätzlich sowohl Disubstitution in den Positionen O-3 und O-2 als auch die Substitution benachbarter Arabinoseeinheiten in Zuckerrübenpektinen nachgewiesen werden (Westphal *et al.* 2010b).

Neben der beschriebenen Grundarchitektur der Arabinane treten in einzelnen Pflanzen strukturelle Besonderheiten auf. So wurden unter anderem in den Arabinanen des Echten Eibisch

und der Straucherbse neben der Furanoseform zusätzlich Arabinoseeinheiten in ihrer Pyranosekonformation als terminale Einheiten nachgewiesen (Capek *et al.* 1983; Swamy und Salimath 1991). In Pektinen aus Oliven und Quinoa konnten darüber hinaus endständige Arabino-furanoseeinheiten in β -Konformation gezeigt werden (Cardoso *et al.* 2002; Wefers *et al.* 2014). Für Sojabohnen-, Zuckerrüben- und Kartoffelpektine war es möglich, vereinzelte terminale Substitutionen der Arabinane mit monomeren oder β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften Galactopyranoseeinheiten nachzuweisen (Nakamura *et al.* 2002b; Sakamoto und Sakai 1995; Øbro *et al.* 2004).

1.1.3.2.2. Typ I (Arabino-)Galactane

Die Grundstruktur der Typ I (Arabino-)Galactane setzt sich aus einem linearen Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D -Galactopyranoseeinheiten zusammen. Diese können zusätzlich terminale oder α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpfte L -Arabinopyranoseeinheiten beinhalten. Eine zusätzliche Substitution der Galactoseeinheiten des Rückgrats kann in den Positionen O -3 und O -6 erfolgen, wobei neben monomeren Galactose- und Arabinoseeinheiten auch kurze α -(1 \rightarrow 5)-glykosidisch verknüpfte Arabinoseketten als Substituenten möglich sind (Aspinall *et al.* 1967; Voragen *et al.* 2009). Darüber hinaus konnten vereinzelte α -(1 \rightarrow 5)-glykosidisch verknüpfte Arabinofuranoseeinheiten innerhalb der Galactankette und β -Arabino-pyranoseeinheiten in Position O -4 als nicht-reduzierende terminale Einheit in Sojapektinen nachgewiesen werden (Huisman *et al.* 2001; Buffetto *et al.* 2015). In Typ I (Arabino-)Galactanen aus Kartoffeln war es zusätzlich möglich, Unterbrechungen des Rückgrats durch β -(1 \rightarrow 3)-glykosidisch verknüpfte Galactoseeinheiten nachzuweisen (Hinz *et al.* 2005). Neben oligo- und polymeren (Arabino-)Galactanketten können auch monomere Galactoseeinheiten an das Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane gebunden sein (Schols *et al.* 1995b; Sun *et al.* 2019). Eine Besonderheit in Okrapektinen sind dabei endständige α - D -Galactoseeinheiten, welche direkt über Position O -4 der Rhamnoseeinheit an das Rückgrat gebunden vorliegen (Sengkhamparn *et al.* 2009).

1.1.3.2.3. Typ II (Arabino-)Galactane

Typ II (Arabino-)Galactane bilden hochverzweigte Strukturen aus und liegen als Bestandteile der Arabinogalactanproteine vor. Die Glykoproteine zeichnen sich durch einen geringen Proteinanteil von meist unter 10 % aus, wobei Hydroxyprolin als Hauptaminosäure überwiegend in die Quervernetzung von Protein- und Kohlenhydratdomäne involviert ist. Die Kohlenhydratkomponente wird in den Verbindungspunkten hauptsächlich von Galactose und in geringeren Anteilen von Arabinose repräsentiert (Showalter 2001). Arabinogalactanproteine liegen stark assoziiert mit Pektinen vor. Bisher konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden, ob Typ II (Arabino-)Galactane dabei kovalente Bindungen mit dem Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane eingehen (Pellerin *et al.* 1995; Immerzeel *et al.* 2006).

1. Einleitung

Strukturell weisen Typ II (Arabino-)Galactane ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 3)-glykosidisch verknüpften D-Galactopyranoseeinheiten auf, welche in Position O-6 mit kürzeren Ketten aus β -(1 \rightarrow 6)-glykosidisch verknüpften Galactoseeinheiten substituiert vorliegen können. Diese können wiederum in den Positionen O-3, O-4 und/oder O-6 mit monomeren oder mit α -(1 \rightarrow 3)- bzw. α -(1 \rightarrow 5)-glykosidisch verknüpften Arabinoseeinheiten verzweigt sein. Vereinzelt kann an Position O-4 außerdem eine Substitution mit einer Galactoseeinheit erfolgen (Carpita und Gibeaut 1993; Yapo 2011b). Zusätzlich wurden Substitutionen an den nicht-reduzierenden Enden der Typ II (Arabino-)Galactanseitenketten mit weiteren Monosacchariden wie β -L-Arabinopyranose, α -L-Rhamnopyranose oder β -D-Mannopyranose nachgewiesen (Clarke *et al.* 1979; Gaspar *et al.* 2001; Caffall und Mohnen 2009). In einer weiteren Studie war es möglich, das seltene Monosaccharid Acofriose als Bestandteil der Kohlenhydratkomponente von Arabinogalactanproteinen des Ginkos, des Meerträubels und des Brotpalmfarns zu identifizieren (Baumann *et al.* 2021).

1.1.3.2.4. Substituierte Strukturen: Hydroxyzimtsäuren

Neben Kohlenhydratstrukturen konnten auch phenolische Säuren als pektin gebundene Einheiten nachgewiesen werden (Hartley und Harris 1981). Dabei liegt *trans*-Ferulasäure vermutlich überwiegend an den Arabinan- und (Arabino-)Galactanseitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane verestert vor. Nach Hydrolyse von isolierten Pektinoligosacchariden aus Spinat, Zuckerrüben und Amaranth wurden bisher in Position O-2 und O-5 von Arabinose- und Position O-6 von Galactoseeinheiten Substitutionen mit Ferulasäure nachgewiesen (Ishii 1994; Bunzel *et al.* 2005). Zusätzlich wurde in Arabinooligosacchariden aus Zuckerrüben gezeigt, dass auch zwei benachbarte Arabinoseeinheiten mit Ferulasäure substituiert vorliegen können (Levigne *et al.* 2004b). Über oxidative, radikalische Kopplung können durch die Aktivität zellwandgebundener Enzyme Oligoferulasäure-*cross-links* ausgebildet werden. In Zuckerrüben konnten dabei neben verschiedener Ferulsäuredimere auch Trimere nachgewiesen werden (Micard *et al.* 1997; Dobberstein und Bunzel 2010). Dabei gab es außerdem Hinweise auf Quervernetzungen zweier Arabinanketten sowie einer Arabinan- und einer Typ I (Arabino-)Galactankette, welche allerdings nicht zweifelsfrei belegt werden konnten (Levigne *et al.* 2004a; Ralet *et al.* 2005a). So können estergebundene Ferulasäureeinheiten vermutlich wiederum zur Stabilität der pflanzlichen Zellwand beitragen.

1.1.3.3. Typ II Rhamnogalacturonane

Bei Typ II Rhamnogalacturonanen handelt es sich um eine hochkomplexe aber über viele Pflanzenspezies hinweg hochkonservierte Einheit von Pektinen. Strukturell zählen Typ II Rhamnogalacturonane zu den substituierten Galacturonanen und weisen so ein Rückgrat aus α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Galactopyranuronsäureeinheiten auf, welche teilweise methylverestert vorliegen können (Voragen *et al.* 2009). Die an Position O-2 und O-3 gebundenen

Seitenketten setzen sich aus 12 unterschiedlichen Monosacchariden zusammen, welche über 20 verschiedene glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sein können (Mohnen 2008). Manche dieser Monosaccharide sind fast ausschließlich auf ihr Vorkommen in Typ II Rhamnogalacturonanen beschränkt. Dazu zählt unter anderem L-Galactose, welche sonst überwiegend aus komplexen Seitenketten von Arabinoxylanen bekannt ist (Allerdings *et al.* 2006). Bei weiteren Vertretern dieser Monosaccharide handelt es sich beispielsweise um L-Acerinsäure und D-Apiose. Letztere ist in die Ausbildung von Borat-Diestern involviert, als welche Einheiten der Typ II Rhamnogalacturonane bevorzugt vorliegen (Scheller *et al.* 2007). Die Dimerisierung erfolgt dabei ausschließlich über die Hydroxygruppen der Apiose in Position 2 und 3 und spielt vermutlich eine wichtige Rolle im Pflanzenwachstum und deren Entwicklung (Ishii *et al.* 1999; O'Neill *et al.* 2004).

1.1.3.4. Xylogalacturonane

Xylogalacturonane zählen ebenfalls zu den substituierten Galacturonanen und liegen in Position O-3 der α -(1→4)-glykosidisch verknüpften D-Galactopyranuronsäureeinheiten partiell über β -glykosidische Bindungen mit D-Xylopyranose substituiert vor. Auch hier können die Galacturonsäuren teilweise methyloverestert vorliegen (Schols *et al.* 1995a). Neben den monomeren Xyloseeinheiten konnten in Erbsenpektinen vereinzelt β -(1→2)-glykosidisch verknüpfte Xyloxedimere als Substituenten nachgewiesen werden (Le Goff *et al.* 2001). Auch in Xylogalacturonanen aus Apfel- und Kartoffelpektinen wurde das Vorkommen von Xyloxedimeren gezeigt, welche allerdings auf β -(1→4)-glykosidischen Bindungen beruhen (Zandleven *et al.* 2006). In den löslichen Polysacchariden von Sojabohnen war es zusätzlich möglich, höheroligomere Xylosesubstituenten bis DP 7 nachzuweisen. So wurde unter anderem ein Tetramer aus drei β -(1→4)-glykosidisch verknüpften Xyloseeinheiten mit einer Verzweigung an Position O-2 der galacturonsäuregebundenen Xyloseeinheit identifiziert (Nakamura *et al.* 2002a). Da eine solche Struktur bisher noch in keiner weiteren Pflanze nachgewiesen werden konnte, handelt es sich dabei vermutlich um eine strukturelle Besonderheit der Xylogalacturonane aus Sojabohnen.

1.1.3.5. Modelle zur makromolekularen Struktur von Pektinen

Die einzelnen Struktureinheiten der Pektine sind bereits vergleichsweise gut charakterisiert. Da es jedoch schwierig ist, die Gesamtheit der Pektinstruktur zu analysieren, gibt es lediglich Hinweise auf das Vorhandensein und die Art der Quervernetzungen zwischen den einzelnen Bereichen. Es wird allerdings angenommen, dass die beschriebenen Struktureinheiten vorwiegend kovalent miteinander verknüpft vorliegen, da eine chemische oder enzymatische Hydrolyse notwendig ist, um diese getrennt voneinander zu isolieren (Mohnen 2008). Auf Grundlage hydrolysebasierter Studien wurden so verschiedene Modelle zur makromolekularen Struktur der Pektine aufgestellt. Als am weitesten verbreitet gilt das Modell der „Smooth and Hairy Regions“ (vgl. Abbildung 2). Die Pektine sind demnach alternierend aus kovalent verknüpften linearen „Smooth Regions“ und

1. Einleitung

verzweigten „Hairy Regions“ aufgebaut (De Vries *et al.* 1982). Zu den unverzweigten Bereichen („Smooth Regions“) zählen dabei die Homogalacturonane, während Typ I Rhamnogalacturonane zusammen mit ihren neutralen Seitenketten den „Hairy Regions“ zugeordnet werden. Die Freisetzung von Typ II Rhamnogalacturonanen nach dem enzymatischen Abbau von Homogalacturonanen mittels *endo*- und *exo*-Polygalacturonase lässt zusätzlich die kovalente Bindung dieser beiden Struktureinheiten vermuten (Ishii und Matsunaga 2001). Eine weiterführende enzymatische Studie legt außerdem nahe, dass Xylogalacturonane ebenfalls kovalent an Homogalacturonane und Typ I Rhamnogalacturonane gebunden sind (Coenen *et al.* 2007).

Verschiedene Erkenntnisse aus weiteren Studien stehen jedoch im Widerspruch zu dem beschriebenen Modell. So wurden Modelle postuliert, in welchen neben Arabinanen und (Arabino-)Galactanen auch Homogalacturonane, Typ II Rhamnogalacturonane sowie Xylogalacturonane vollständig oder teilweise als Seitenketten des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane vorliegen (Vincken *et al.* 2003; Yapo 2011a). Die verschiedenen Modelle können bisher weder gesamtheitlich bestätigt noch widerlegt werden.

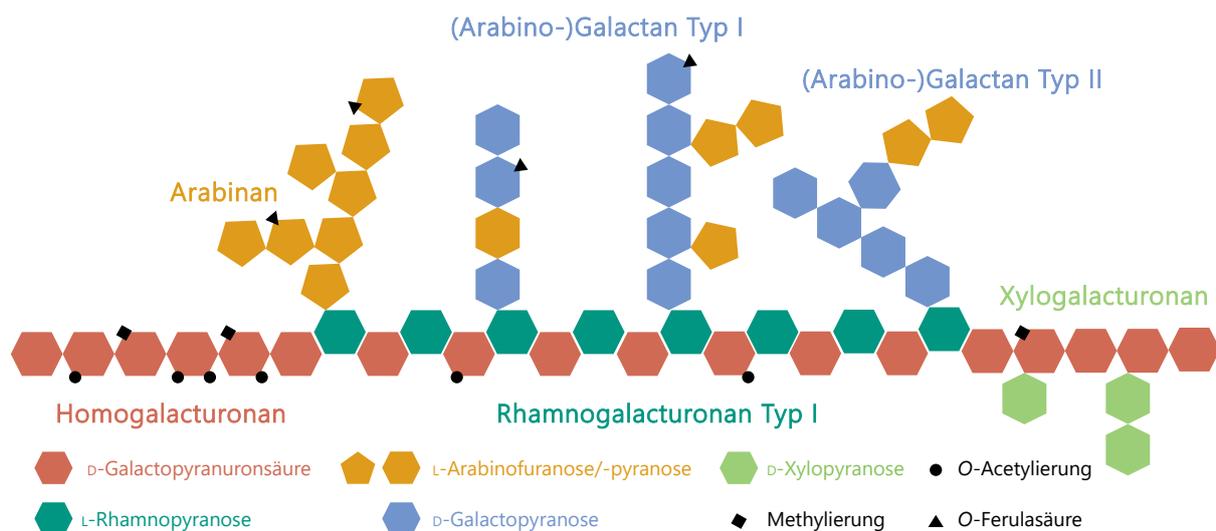


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur von Pektinen ohne Typ II Rhamnogalacturonane nach dem „Smooth and Hairy Region“ Modell von De Vries *et al.* (1982). Hier gezeigt sind Homogalacturonane als „Smooth Regions“, welche kovalent mit den „Hairy Regions“, den Typ I Rhamnogalacturonanen und den Xylogalacturonanen, verknüpft vorliegen

1.2. EXTRAKTION VON PEKTINEN

Um Pektine getrennt von anderen Zellwandpolysacchariden analytisch betrachten zu können oder einen Einsatz in der Lebensmittelindustrie zu ermöglichen, ist deren Extraktion aus dem Zellwandkomplex notwendig. Dies erfolgt über die Hydrolyse der intermolekularen Bindungen zwischen den Pektinen und weiteren Zellwandbestandteilen sowie der anschließenden Solubilisierung der freigesetzten Strukturen. Dabei gibt es zahlreiche Parameter, welche je nach Anwendungszweck variiert werden können und so in unterschiedlichen Struktureigenschaften der freigesetzten Pektine resultieren. Insgesamt kann der Extraktionsprozess in drei Abschnitte

gegliedert werden; die Vorbehandlung des Ausgangsmaterials, die Extraktion der Pektine sowie die Weiterverarbeitung des Extraktes.

Bereits die Vorbereitung des Rohstoffs für die Extraktion kann einen Einfluss auf die Struktur des resultierenden Pektins haben. So wird das Material teilweise gewaschen, blanchiert und getrocknet, um pektinspaltende Enzyme und Mikroorganismen zu inaktivieren und so einem möglichen Abbau der Pektinstruktur vorzubeugen (Chan *et al.* 2017). Durch einen anschließenden Mahlvorgang kann mit zunehmender Vergrößerung der Oberfläche eine stetig steigende Ausbeute erzielt werden. Für Zuckerrübenpektine konnte beispielsweise bei geringerer Partikelgröße ein Anstieg des Galacturonsäureanteils festgestellt werden (Huang *et al.* 2018).

Die klassische Pektinextraktion kann mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln und -zeiten bei meist erhöhten Temperaturen erfolgen, wobei es sich bei den gängigsten Verfahren um wässrige und säureunterstützte Verfahren handelt. Weitere Möglichkeiten sind der Einsatz von Puffern oder Basen. Bei der Auswahl des Extraktionsmittels ist zu beachten, dass im neutralen bzw. basischen pH-Bereich eine Spaltung des Rückgrats der Homogalacturonane über β -Eliminierungsreaktionen (vgl. Abbildung 3) erfolgt, was in geringeren Kettenlängen resultiert (Kravtchenko *et al.* 1992a). Zusätzlich kommt es zu einer partiellen Entesterung der Pektine (Rombouts und Thibault 1986).

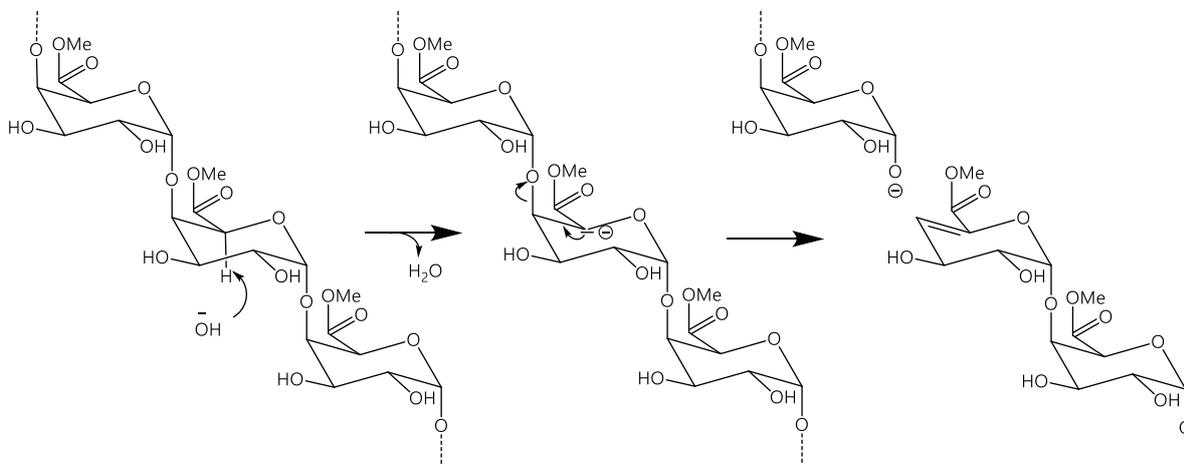


Abbildung 3: Mechanismus der Spaltung von methylveresterten Galacturonsäureeinheiten von Homogalacturonanen durch β -Eliminierung. Me: Methylgruppe

Niedrigere pH-Werte resultieren dahingegen in höheren Ausbeuten, was auf die verbesserte Hydrolyse der intermolekularen Bindungen zwischen löslichen Pektinen und unlöslichen Zellwandpolysacchariden zurückzuführen ist. Dabei kann es zu einer zunehmenden Spaltung der säurelabilen glykosidischen Bindungen in oligo- und polymeren Ketten aus furanosidischen Monomeren kommen, wodurch insbesondere die Arabinane der Typ I Rhamnogalacturonane beeinflusst werden. So erfolgt unter dem Einfluss von niedrigeren pH-Werten und verlängerten Extraktionszeiten eine Reduktion des Verzweigungsgrades sowie eine Abnahme des gesamten Arabinoseanteils (Bindereif *et al.* 2021). Da glykosidische Bindungen zwischen Uronsäuren deutlich stabiler sind, weisen unter solch harschen Bedingungen extrahierte Pektine eine mit Galacturon-

1. Einleitung

säure angereicherte Struktur auf (Denman und Morris 2015). Weitere Einflussfaktoren auf die Ausbeute und Pektinstruktur können die eingesetzte Säure, die Verwendung von Chelatbildnern, das Flüssigkeit-zu-Feststoff-Verhältnis sowie die Extraktionstemperatur sein (Yapo 2009; Renard und Thibault 1993; Kulkarni und Vijayanand 2010; Pagán und Ibarz 1999). Insgesamt ist bei der Pektinextraktion ein Abwägen zwischen dem Erhalt der Struktur bei milderer Bedingungen und einer steigenden Ausbeute unter zunehmend härteren Bedingungen notwendig.

Neben der meist säurebasierten Pektinextraktion gibt es weitere, beispielsweise enzymatisch unterstützte Verfahren. Häufig werden dafür Enzyme wie Cellulasen, Hemicellulasen sowie Proteasen eingesetzt, durch welche die Zellwandmatrix hydrolytisch so gespalten werden soll, dass die Zugänglichkeit der Pektine erhöht wird. So können bei höheren pH-Werten, niedrigeren Temperaturen sowie kürzeren Extraktionszeiten ähnliche Ausbeuten wie bei der Säureextraktion erzielt werden. Nachteile können neben dem hohen Kostenaufwand auch pektinolytische Nebenaktivitäten der Enzyme sein, welche in einer Modifikation der Pektinstruktur resultieren (Adetunji *et al.* 2017). Weitere Verfahren sind unter anderem mikrowellen- und ultraschallunterstützte Extraktionen, durch welche die Extraktionszeit und der Lösungsmiteinsatz verringert werden kann. Aufgrund der harschen Bedingungen können diese Extraktionen ebenfalls in Modifikationen der Pektinstruktur resultieren (Bagherian *et al.* 2011; Sabater *et al.* 2020).

Nach dem Extraktionsverfahren wird der wässrige Extrakt mit den enthaltenen Pektinen über Filtration oder Zentrifugation von den übrigen Feststoffen abgetrennt. Die Pektine können durch die Zugabe von beispielsweise Methanol, Ethanol oder Isopropanol aufgrund ihres spezifischen Löslichkeitsverhaltens präzipitiert und so von alkohollöslichen Komponenten separiert werden. Anschließend sind weitere Modifikationen wie das alkalische oder ammoniakbasierte Entestern der Pektinstruktureinheiten möglich, woraus Pektine mit niedrigem DM oder amidierete Pektine resultieren (May 1990).

Bei den kommerziell am weitesten verbreiteten Methoden zur Pektinextraktion handelt es sich um säurebasierte Verfahren, bei denen überwiegend mineralische Säuren bei einem pH-Wert von 1,5 - 2,5 unter erhöhten Temperaturen (70 - 90 °C) eingesetzt werden (May 1990). Grund dafür ist, dass kommerziell vertriebene Pektine die Voraussetzungen der Verordnung (EU) Nr. 231/2012 erfüllen müssen. Diese besagt, dass Pektine einen Galacturonsäureanteil der aschefreien Trockenmasse von mindestens 65 % aufweisen müssen (VO (EU) Nr. 231/2012). Aufgrund dieser Vorgabe ist der kommerzielle Einsatz strukturell diverser Pektine stark limitiert, wodurch die Vielfalt und Komplexität der Pektinstruktur nicht im vollen Umfang wertgeschöpft werden kann. Neben dem Extraktionsverfahren haben auch die jeweiligen Rohstoffe einen starken Einfluss auf die resultierenden Pektinstrukturen. Als Pektinquellen eignen sich dabei insbesondere pektinangereicherte Industrienebenströme, wie sie beispielsweise in der Saftindustrie anfallen. Mit einer Produktionsmenge von rund 586 Millionen Litern Apfelsaft und rund 524 Millionen Litern

Orangensaft im Jahr 2021 fallen laut Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) allein in Deutschland große Mengen an Fruchtfleisch, Schalenbestandteilen, Kernen und Stängeln in Form von Trestermaterial an (BMEL 2022b, 2022c). Durch ihren mit 15 - 20 % für Apfeltrester und 30 - 35 % für Citruschalen vergleichsweise hohen Gehalt an Pektinen handelt es sich bei beiden Industrienebenströmen um weit verbreitete Ausgangsmaterialien für die kommerzielle Pektinproduktion (May 1990; Adetunji *et al.* 2017). Als eine neuere Pektinquelle haben sich Zuckerrübenschnitzel erwiesen, welche während der Zuckerproduktion anfallen. Durch eine deutschlandweite Erntemenge an Zuckerrüben von etwa 30 Millionen Tonnen im Jahr 2021 und deren lokale Verarbeitung, handelt es sich so um eine zusätzliche regionale Quelle für die Pektinindustrie (BMEL 2022a). Weitere mögliche Rohstoffe wie Karottentrester sind bisher quantitativ unbedeutend für die kommerzielle Pektinergänzung.

1.3. EIGENSCHAFTEN VON PEKTINEN

1.3.1. Technofunktionelle Eigenschaften

Die vielfältige und komplexe Struktur der Pektine sowie die möglichen Modifikationen während und nach der Extraktion können einen großen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Pektine haben. In der Lebensmittelindustrie werden sie bisher überwiegend als Gelbildner eingesetzt, wobei insbesondere Apfel- und Citruspektine von Relevanz sind. Durch die in Kapitel 1.1.3.1. beschriebenen Gelbildungsmechanismen sind Pektine mit unterschiedlichem DM für unterschiedliche Zwecke geeignet. So können niedrigveresterte Pektine in zuckerreduzierten Lebensmitteln als Gelbildner fungieren, während hochveresterte Pektine für die Ausbildung des Gels einen hohen Zuckeranteil im Produkt benötigen (May 1990). Wichtig für beide Gelbildungsmechanismen sind homogalacturonanreiche Pektine, da die neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane die Gelbildung negativ beeinflussen (Thakur *et al.* 1997). Ferulasäurereiche Pektine wie Zuckerrübenpektine können zusätzlich über enzymatische Katalyse oxidativ quervernetzt werden und so starke, kovalent verknüpfte Gele ausbilden (Oosterveld *et al.* 2000; Junker *et al.* 2021). Als weitere Eigenschaft weisen Zuckerrübenpektine die Fähigkeit zur Stabilisierung von Öl-in-Wasser-Emulsionen auf. Dabei werden unter anderem der hohe Gehalt an Proteinen und/oder estergebundener Ferulasäure als Ursachen für die guten Emulgierereigenschaften diskutiert (Funami *et al.* 2007; Siew und Williams 2008). In weiteren Studien konnte ein positiver Zusammenhang zwischen einem erhöhten Anteil an insbesondere langkettigen Arabinanen und den hervorragenden emulgierenden Eigenschaften von Zuckerrübenpektinen hergestellt werden (Bindereif *et al.* 2021; Eichhöfer *et al.* 2023).

1. Einleitung

1.3.2. Ernährungsphysiologische Eigenschaften

Neben den technofunktionellen Eigenschaften werden für Pektine einige ernährungsphysiologisch positive Effekte diskutiert. Dabei konnten einzelne Strukturcharakteristika durch ihre Beeinflussung des funktionellen Verhaltens der Pektine mit unterschiedlichen Eigenschaften im Gastrointestinaltrakt in Verbindung gebracht werden. So beeinflussen die Anzahl und Verteilung der Methylgruppen sowie das Molekulargewicht der Pektine das Löslichkeitsverhalten und so eine mögliche Viskositäts-erhöhung. Außerdem können Pektine mit geringerem Anteil an neutralen Seitenketten stärkere Gele ausbilden und so ebenfalls die Viskosität im Verdauungstrakt erhöhen. Dies wird zusammen mit einem hohen Wasserbindevermögen unter anderem als Grund für eine mit der Aufnahme von Pektinen einhergehende verlangsamte Magenentleerung diskutiert (Burkitt *et al.* 1972; Holt *et al.* 1979). Außerdem führt der Verzehr von viskositäts-erhöhenden oder gelbildenden Ballaststoffen zu einem stärkeren und länger anhaltenden Sättigungsgefühl, was unter anderem auf die Stimulierung von Dehnungsrezeptoren zurückgeführt werden kann (Kristensen und Jensen 2011). In einer weiterführenden Studie konnte gezeigt werden, dass strukturell unterschiedliche Pektine nicht in den gleichen Effekten im Gastrointestinaltrakt resultieren. So wurde ein stärker ausgeprägtes Sättigungsgefühl bei gelbildenden im Vergleich zu lediglich viskositäts-erhöhenden Pektinen nachgewiesen (Wanders *et al.* 2014).

Die ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften von Pektinen haben zu der Auslobung von *Health Claims* durch die EFSA geführt. Basierend auf den gelbildenden und viskositäts-erhöhenden Eigenschaften von Pektinen umfassen die dabei gelisteten Eigenschaften die Aufrechterhaltung eines normalen Cholesterinspiegels im Blut sowie einen geringeren Anstieg des postprandialen Blutzuckerspiegels (EFSA 2010; Jenkins *et al.* 1975; Holt *et al.* 1979).

1.4. FERMENTATION VON PEKTINEN

Als weitere ernährungsphysiologische Eigenschaft wird eine potentiell positive Beeinflussung der Darmmikrobiota durch Pektine und Pektinoligosaccharide diskutiert (Larsen *et al.* 2019; Hotchkiss *et al.*). Grundlegend dafür ist, dass Pektine als Ballaststoffe von keinen der im oberen Verdauungstrakt aktiven Enzyme abgebaut werden können. So gelangen sie zu großen Teilen intakt in den Dickdarm, wo sie von Darmbakterien fermentiert werden können.

1.4.1. Bildung intermediärer Spaltungsprodukte

Die Pektinfermentation im humanen Verdauungstrakt ist in verschiedene Phasen untergliedert und beginnt mit der Umsetzung der polymeren Strukturen über bakterielle, kohlenhydrataktive Enzyme (*Carbohydrate-Active Enzymes*, CAZymes). Im humanen Kolon gibt es verschiedene Bakteriengattungen, welche auf den Abbau unterschiedlicher Strukturen spezialisiert sind. Für die Metabolisierung von Pektinen im humanen Kolon sind dabei primär die Gattungen *Bacteroides*

und *Prevotella* verantwortlich (Larsen *et al.* 2019). Der Abbau der Pektine erfolgt bei Bakterien der Gattung *Bacteroides* über sogenannte *Polysaccharide-Utilization Loci* (PULs). Die Genome der PULs beinhalten Gensequenzen, welche glykanspezifische Multiproteinsysteme codieren. Diese sogenannten *Starch Utilization System-(Sus)-like Systems* weisen unter anderem Proteine auf, welche für die Erkennung, den Transport und die Bindung von Polysacchariden verantwortlich sind (Grondin *et al.* 2017). Die ebenfalls enthaltenen CAZymes ermöglichen die anschließende Metabolisierung der Polysaccharide in ihre intermediären Spaltprodukte (El Kaoutari *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2018). Dabei können einzelne Bakterien mehrere PULs aufweisen, welche in die Metabolisierung unterschiedlicher Polysaccharide involviert sind. So konnten einzelne Bakterien mit sowohl xylan- als auch pektinabbauenden Eigenschaften identifiziert werden (Despres *et al.* 2016a; Despres *et al.* 2016b). Aufgrund der komplexen Struktur werden für die Metabolisierung von Pektinen mehrere unterschiedliche CAZymes in den *Sus-like Systems* benötigt (El Kaoutari *et al.* 2013).

Als relevante pektinolytische Enzyme im Dickdarm wurden bisher insbesondere *endo-*, aber auch *exo*-Pektatlyasen nachgewiesen, welche über eine β -Eliminierungsreaktion zwischen zwei unveresterten Galacturonsäureeinheiten spalten (Olano-Martin *et al.* 2002; Jensen und Canale-Parola 1985). Dabei werden unter anderem ungesättigte Oligogalacturonsäurestrukturen mit einer 4,5-Doppelbindung am nicht-reduzierenden Ende gebildet, wie sie bereits in *in vitro* Fermentationsstudien als Zwischenmetabolite nachweisbar waren (Dongowski und Lorenz 1998; Dongowski *et al.* 2002). Zusätzlich konnte das Vorkommen von *endo*-Polygalacturonasen im humanen Kolon gezeigt werden (McCarthy *et al.* 1985). Die Enzyme spalten hydrolytisch zwischen zwei unveresterten Galacturonsäureeinheiten, was in gesättigten mono- und oligomeren Galacturonsäurestrukturen resultiert. Bei den genannten Enzymen sind Methyl- aber auch Acetylsubstitutionen ein limitierender Faktor für den Abbau des Homogalacturonans. Die Produktion von Pektinmethylesterasen einiger humaner Darmbakterien lässt auf deren Beteiligung an der Fermentation schließen, um so die Zugänglichkeit hochmethylierter Pektine zu verbessern (Nakajima *et al.* 1999; Chung *et al.* 2017).

Für das Bakterium *Monoglobus pectinilyticus* konnten Gensequenzen nachgewiesen werden, welche viele pektinmetabolisierende Enzyme wie Pektinacetylerasen und Rhamnogalacturonanlyasen codieren. In weiterführenden Inkubationsstudien konnte bestätigt werden, dass die bakteriellen Enzyme von *M. pectinilyticus* das Rückgrat von Typ I Rhamnogalacturonanen metabolisieren können (Kim *et al.* 2019). Die Fähigkeit, neutrale Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane abzubauen, konnte für bakterielle Enzyme der Gattung *Bifidobacterium* gezeigt werden und erfolgt unter anderem über β -Galactosidasen, *endo*-Galactanasen, Arabinofuranosidasen sowie *endo*-Arabinanasen. Über eine Extraktion der bakteriellen Enzyme nach *in vitro* Fermentation von Chicorréewurzeln und deren Inkubation mit unterschiedlich extrahierten

1. Einleitung

Zellwandbestandteilen konnte die Aktivität der Enzyme bestätigt werden (Onumpai *et al.* 2011; Ramasamy *et al.* 2014).

Für Typ II Rhamnogalacturonane konnte gezeigt werden, dass das Darmbakterium *Bacteroides thetaiotaomicron* in der Lage ist, einen Großteil der Bindungen des komplexen Polysaccharids zu spalten. Die involvierten PULs codieren dabei unter anderem für α -L-Rhamnosidasen und α -L-Arabinosidasen. Weiter sind auch eine β -L-Arabinofuranosidase sowie eine β -D-Glucuronidase an dem Abbau des Typ II Rhamnogalacturonans beteiligt (Ndeh *et al.* 2017).

Aus den während der Pektinfermentation freigesetzten Oligosacchariden können durch weitere enzymatische Umsetzung die entsprechenden Monosaccharide oder instabile Metabolite wie 4-Deoxy-L-threo-5-hexulose-uronat gebildet werden, was vermutlich sowohl extra- als auch intrazellulär stattfinden kann (Preiss und Ashwell 1963; Dongowski *et al.* 2000).

Insgesamt handelt es sich bei der Fermentation von Pektinen um einen multifaktoriellen Prozess mit einer Vielzahl an unterschiedlichen beteiligten CAZymes mit pektinolytischen Eigenschaften. Die zugrundeliegenden Aktivitäten und Mechanismen zur Metabolisierung der Pektinstrukturen und somit zur Bildung der intermediären oligomeren und monomeren Spaltprodukte sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.4.2. Bildung von kurzkettigen Fettsäuren

Die aus der enzymatischen Metabolisierung der Pektine resultierenden Monosaccharide können im Dickdarm anaerob in die jeweiligen Fermentationsendprodukte umgesetzt werden. Dabei werden über eine Vielzahl an enzymatischen Reaktionen neben SCFA auch Gase wie Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff und Methan gebildet. Bei den SCFA, welche bei der Fermentation von Pektinen primär freigesetzt werden, handelt es sich um Acetat, *n*-Propionat und *n*-Butyrat (Macfarlane und Macfarlane 2003). Diese können im Kolon über unterschiedliche Wege gebildet werden (Abbildung 4). Hexosen folgen dabei zunächst dem Embden-Meyerhof-Parnas Weg (Glykolyse), während Pentosen über den Pentose-Phosphat-Weg umgesetzt werden. Als Produkt wird bei beiden Reaktionen Phosphoenolpyruvat (PEP) gebildet, welches in Pyruvat überführt als Ausgangsprodukt für alle genannten SCFA dienen kann (Koh *et al.* 2016). Uronsäuren werden dahingegen entlang eines modifizierten Entner-Doudoroff-Wegs umgesetzt, wodurch über Intermediate wie Tagaturonat und 2-Keto-3-desoxygluconat ebenfalls Pyruvat gebildet wird (Kim *et al.* 2019). Die Umsetzung von Desoxyhexosen erfolgt über einen abweichenden Weg ohne PEP und Pyruvat als intermediäre Produkte (Nogal *et al.* 2021).

Bei der Bildung von Acetat gibt es einerseits die Möglichkeit der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat in Acetyl-Coenzym A (CoA) und dessen anschließender Umsetzung mittels Acetyl-CoA-Hydrolase zu Acetat. Andererseits ist eine Bildung über den Wood-Ljungdahl-Weg möglich, bei welchem aus Pyruvat mittels acetogener Bakterien Kohlenstoffdioxid unter der Freisetzung von Wasserstoff gewonnen wird. Über die Reduktion zu Kohlenstoffmonoxid und dessen Umsetzung

1.4. Fermentation von Pektinen

mit einer Methylgruppe und einem CoA-Molekül kann Acetyl-CoA gebildet werden, woraus wiederum Acetat enzymatisch freigesetzt werden kann (Ragsdale und Pierce 2008).

Die Bildung von Propionat weist eine höhere Substratspezifität auf und kann über verschiedene Reaktionen erfolgen. Beim Succinat-Weg erfolgt dabei eine Carboxylierung von PEP unter der Bildung von Oxalacetat, welches sukzessive in Fumarat umgesetzt wird. Ein Zusammenspiel aus Elektronentransferreaktionen und der Aktivität der Fumarat-Reduktase resultiert in der Bildung von Succinat. Unter einem geringen Kohlenstoffdioxid-Partialdruck wird dieses über verschiedene intermediäre Produkte sowie unter Kohlenstoffdioxid-Freisetzung zu Propionyl-CoA und enzymatisch weiter zu Propionat umgesetzt (Louis und Flint 2017; Nogal *et al.* 2021). Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von Propionat ist der Acrylat-Weg, welcher allerdings nur in wenigen Darmbakterien verbreitet ist. Hierbei wird Pyruvat über die Oxidation von Nicotinamid-adenin dinucleotid (NADH/NAD⁺) zu Laktat reduziert. Enzymatisch erfolgt anschließend die Umsetzung über die Intermediate Laktoyl-CoA, Acrylyl-CoA und Propionyl-CoA zu Propionat (Louis und Flint 2017). Aus Desoxyzuckern wie Rhamnose kann über den Propandiol-Weg ebenfalls Propionat gebildet werden. Die intermediäre Bildung von Dihydroxyacetonphosphat und L-Lactaldehyd resultiert in einer Synthese von 1,2-Propandiol. Über Propionaldehyd und Propionyl-CoA kommt es schließlich zur Bildung von Propionat (Nogal *et al.* 2021).

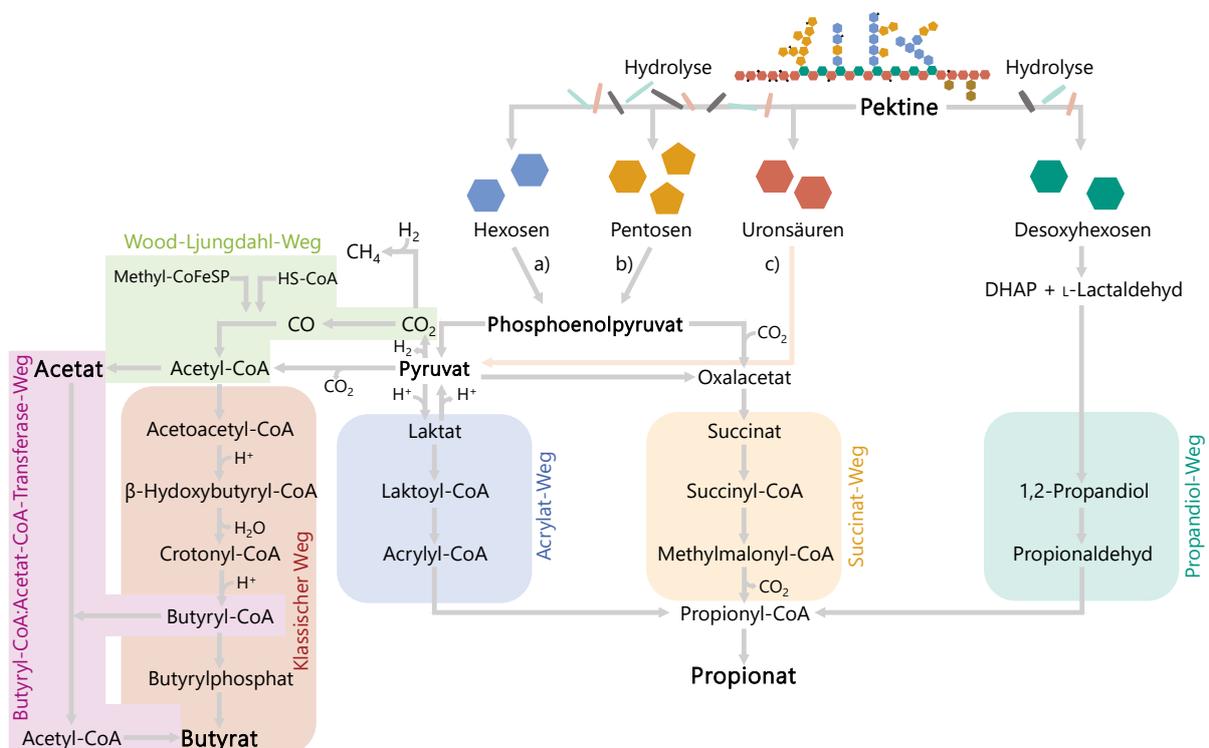


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen möglichen Wege zur Bildung der quantitativ dominierenden *Short-Chain Fatty Acids* Acetat, Propionat und Butyrat. a: Glykolyse, b: Pentose-Phosphat-Weg, c: modifizierter Entner-Doudoroff-Weg, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, H: Wasserstoff, P: Protein, S: Schwefel. Modifiziert nach Ndeh *et al.* (2017)

1. Einleitung

Die Bildung von Butyrat ist ebenfalls substratspezifisch und beginnt mit der Umsetzung zweier Acetyl-CoA-Moleküle zu Acetoacetyl-CoA. Mittels Reduktionsreaktionen wird dieses über mehrere Zwischenprodukte in Butyryl-CoA umgesetzt. Hier kann die Synthese einerseits über den sogenannten klassischen Weg fortgeführt werden, bei welchem mehrere enzymkatalysierte Reaktionen über intermediäres Butyrylphosphat zur Bildung von Butyrat führen (Louis *et al.* 2004). Andererseits ist eine Umsetzung über den Butyryl-CoA:Acetat-CoA-Transferase-Weg möglich, bei welchem exogen gewonnenes Acetat mit Butyryl-CoA zu Acetyl-CoA und Butyrat umgesetzt wird (Duncan *et al.* 2002). Neben den beschriebenen SCFA Acetat, Propionat und Butyrat können Formiat und Valerat sowie *Branched-Chain Fatty Acids* (BCFA) in geringeren Mengen während der Pektinfermentation gebildet werden (Gulfi *et al.* 2005).

Die Bildung der verschiedenen SCFA wird unter anderem von der Ausgangsstruktur der Pektine beeinflusst. So konnte ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anteil an gebildetem Propionat und Typ I Rhamnogalacturonanen sowie hochmethylierten Pektinen hergestellt werden (Gulfi *et al.* 2005; Gulfi *et al.* 2007; Larsen *et al.* 2019). Zusätzlich konnte bei kürzeren *in vitro* Fermentationszeiten (8 h) eine höhere SCFA-Gesamtkonzentration für niedrigveresterte Pektine festgestellt werden, während nach 72-stündiger Fermentation ein gegensätzliches Ergebnis erzielt wurde (Dongowski *et al.* 2000; Larsen *et al.* 2019). Dies lässt sich vermutlich auf eine schnellere mikrobielle Umsetzung von niedrigmethylierten Pektinen zurückführen (Dongowski *et al.* 2000). Ein Zusammenhang ließ sich außerdem zwischen einem erhöhten Neutralzuckeranteil in Pektinen und einer höheren Gesamtkonzentration an SCFA herstellen (Onumpai *et al.* 2011).

Die gebildeten SCFA werden über verschiedene Mechanismen sehr effizient in nahezu allen Regionen des Dickdarms aufgenommen und erfüllen dort unterschiedliche Funktionen. Butyrat dient beispielsweise als lokale Hauptenergiequelle der Darmepithelzellen, wo es zusätzlich einen wichtigen Faktor für die Zellproliferation und -differenzierung darstellt. Acetat und Propionat werden dahingegen in deutlich geringeren Anteilen von den Darmzellen aufgenommen und verwertet. Unmetabolisierte SCFA werden über das Blut zur Leber transportiert und können dort von den Leberzellen umgesetzt werden (Cummings *et al.* 1987). Dabei bleiben variierende Anteile an Acetat unmetabolisiert, welche die Blut-Hirn-Achse passieren und so unter anderem Einfluss auf das Sättigungsgefühl haben können (Frost *et al.* 2014). Zusätzlich können SCFA auch unresorbiert verschiedene Funktionen erfüllen. So wird durch ihre Bildung der vorherrschende intra- und extrazelluläre pH-Wert beeinflusst, was wiederum indirekt Auswirkungen auf die Mikrobiota im Darm haben kann (Louis und Flint 2017).

1.4.3. Beeinflussung der Darmmikrobiota

Die humane Darmmikrobiota setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen zusammen, wobei überwiegend Bakterien der Stämme *Bacteroidetes* und *Firmicutes* vertreten

sind (Turnbaugh *et al.* 2007). Durch die Aufnahme von Ballaststoffen kann die Zusammensetzung, Diversität und Quantität der Mikroorganismen beeinflusst werden. Dabei stehen insbesondere die gesundheitsfördernden Bakteriengattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* im Fokus. Deren ansteigende Wachstumsrate dient zusammen mit einem Rückgang der Bakteriengattungen *Clostridium* und *Bacteroides* als Kriterium für eine prebiotische Aktivität (Al-Tamimi *et al.* 2006). Bei Pektinen ist die Beeinflussung verschiedener Darmbakterien aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt nicht immer eindeutig. So konnte für Pektine und Pektinoligosaccharide teilweise die Stimulierung des Wachstums von Bifidobakterien nachgewiesen werden (bifidogener Effekt), während deren Konzentration in andere Studien unverändert blieb (Olano-Martin *et al.* 2002; Leijdekkers *et al.* 2014). Durch die Betrachtung einzelner Pektinstruktureinheiten war es möglich, den bifidogenen Effekt einzugrenzen. Dabei konnte für verschiedene Homogalacturonanstrukturen kein vermehrtes Wachstum von Bifidobakterien festgestellt werden, während deren Konzentration bei einer Fermentation von Arabinanen und (Arabino-)Galactanen teilweise stark anstieg (Onumpai *et al.* 2011; Holck *et al.* 2011; Sulek *et al.* 2014). Bei polymeren Pektinen mit einem hohen Anteil an neutralen Seitenketten konnte zusätzlich eine erhöhte Wachstumsrate von Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Enterococcus* gezeigt werden (Larsen *et al.* 2019; Ferreira-Lazarte *et al.* 2018). Galacturonsäurereiche Pektine stimulierten in Fermentationsstudien dahingegen das Wachstum des gesundheitsfördernden Bakteriums *Faecalibacterium prausnitzii*, was für Neutralzucker nicht nachgewiesen werden konnte (Onumpai *et al.* 2011; Larsen *et al.* 2019). Einige Studien konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen einem geringeren Molekulargewicht und einer schnelleren bzw. stärkeren Stimulation des *Bifidobacterium*- und *Lactobacillus*-Wachstums feststellen (Olano-Martin *et al.* 2002; Al-Tamimi *et al.* 2006; Chen *et al.* 2013). Larsen und Mitarbeitende (2019) konnten zusätzlich das geförderte Wachstum der positiv bewerteten Bakterienspezies *F. prausnitzii* und der Familie der *Ruminococcaceae*n durch hochmethylierte Pektine zeigen. Bezüglich des bifidogenen Effekts scheint der Methylierungsgrad der Pektine und Pektinoligosaccharide in *in vitro* Fermentationsstudien keinen ausgeprägten Einfluss zu haben (Ferreira-Lazarte *et al.* 2018; Larsen *et al.* 2019; Gómez *et al.* 2016). Neben einer erhöhten Wachstumsrate positiv bewerteter Bakterien wurde allerdings auch das geförderte Wachstum von potentiell schädlichen Bakterien wie *Prevotella copri* bei der Fermentation von Pektinen nachgewiesen (Ferreira-Lazarte *et al.* 2018; Larsen *et al.* 2019). Dieses wird unter anderem mit chronischen Entzündungsreaktionen wie rheumatoider Arthritis in Zusammenhang gebracht (Pianta *et al.* 2017; Larsen 2017).

Insgesamt handelt es sich bei der Pektinfermentation um ein fluides System, welches sich aus dem enzymatischen Abbau der Pektine in ihre Monomereinheiten sowie der Verwertung der daraus gebildeten SCFA zusammensetzt. So ergeben sich stetig verändernde Konzentrationen und Zusammensetzungen an (freigesetzten) Pektinstruktureinheiten, SCFA und Bakterien im humanen Kolon.

2. ZIELSETZUNG

Pektine sind ein quantitativ bedeutender Bestandteil der Zellwand dikotyler Pflanzen. Sie verfügen über eine komplexe Struktur, welche sich aus unterschiedlichen polymeren Struktureinheiten (unter anderem Homogalacturonane und Typ I Rhamnogalacturonane mit neutralen Seitenketten) zusammensetzt. Durch ihre Zugehörigkeit zur Stoffgruppe der Ballaststoffe gelangen sie zunehmend in den Fokus einer gesundheitsbewussten Ernährung. Viele der dabei diskutierten ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften beruhen auf der Fermentierbarkeit der Pektine durch Bakterien im humanen Kolon. Dabei sind bisher überwiegend wissenschaftliche Daten zur Bildung von kurzkettigen Fettsäuren sowie der Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota im Zuge der Pektinfermentation bekannt. Wurden strukturelle Charakteristika bei diesen Untersuchungen berücksichtigt, waren diese meist auf vergleichsweise wenig komplexe Pektine oder Pektinstruktureinheiten beschränkt. Um die intestinale Fermentation der Pektine detailliert beschreiben zu können, ist jedoch eine strukturbasierte Untersuchung der Metabolisierung von Pektinen unerlässlich. Ziel dieser Arbeit ist es daher, strukturell unterschiedliche Pektine in verschiedenen Fermentationsstudien umzusetzen und unter anderem über den Nachweis intermediär auftretender Spaltprodukte Rückschlüsse auf die Kinetik sowie möglicherweise nur langsam fermentierbare Pektinstruktureinheiten ziehen zu können.

Aufgrund der hohen Relevanz wurden für die Fermentationsstudien unter anderem Pektine gewählt, welche bereits im kommerziellen Maßstab produziert werden und als Lebensmittelzusatzstoffe bewährt sind. Dabei ist allerdings zu beachten, dass diese aufgrund der harschen Säureextraktionsbedingungen und der damit einhergehenden weitgehenden Abspaltung neutraler Seitenketten über einen hohen Anteil an Homogalacturonanen und somit über eine geringe Diversität verfügen. Daher sollten in dieser Arbeit zudem Pektine im labortechnischen Maßstab unter milderer Bedingungen extrahiert werden. So sollten Pektine mit komplexeren Strukturen erhalten werden, bei deren Untersuchung ein Fokus auf die neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane gelegt werden kann. Um strukturelle Besonderheiten der kommerziell bzw. labortechnisch aus den Rohstoffen Citruschalen, Apfeltrester und Zuckerrübenschnitzeln extrahierten Pektine zu ermitteln, sollten diese umfassend strukturcharakterisiert werden.

Erste Rückschlüsse auf die enzymatische und bakterielle Abbaubarkeit der Pektine sollten durch *in vitro* Fermentationen mit Enzympräparaten sowie mit humanen Fäzesproben gezogen werden. Eine Probennahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten gefolgt von der chemischen Analytik sollte dabei eine zeitabhängige Betrachtung der Pektinfermentation ermöglichen. Allerdings ist bei Fäzesproben zu beachten, dass diese nur einen Bruchteil der Bakterien im humanen Kolon abbilden und die Metabolisierung der Pektine im *in vitro* Modell daher nicht unmittelbar auf die tatsächliche humane Umsetzung übertragbar ist. Daher sollten ausgewählte Pektine zusätzlich in

2. Zielsetzung

in vivo Fermentationsstudien mit Mäusen und Menschen eingesetzt werden, um die Fermentation im lebenden Organismus abzubilden. Dabei ist zu beachten, dass in *in vivo* Studien lediglich nicht fermentierte Struktureinheiten strukturanalytisch bestimmt werden können und der zeitliche Verlauf der Fermentation nicht beschrieben werden kann. Die Fermentationsexperimente sollten dabei mit KIT-externen Kooperationspartnern durchgeführt werden. Alle chemisch-präparativen sowie analytischen Fragestellungen sollten in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie am KIT bearbeitet werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. BESCHREIBUNG DER KOMMERZIELLEN PEKTINE

Die in dieser Arbeit eingesetzten kommerziellen Pektine sollten bereits eine Relevanz in der Lebensmittelindustrie aufweisen und sich dennoch durch strukturelle Unterschiede innerhalb des rechtlichen Rahmens auszeichnen. Daher wurden sechs Pektine verwendet, welche von der Firma Herbstreith & Fox GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt wurden. Dabei handelt es sich um ein hochverestertes und zwei niedrigveresterte Citruspektine, welche durch den Hersteller als Classic C, Classic CU901 und Classic CU902 bezeichnet werden. Im Folgenden werden die Pektine entsprechend mit CP1, CP2 und CP3 abgekürzt. Daneben sind zwei Apfelpektine Gegenstand dieser Arbeit, wobei Classic A (AP1) laut Hersteller ein höheres Molekulargewicht aufweist als Herbapekt SF 50-LV (AP2). Das untersuchte Zuckerrübenpektin Betapec RU301 hat laut Hersteller den geringsten Anteil an Galacturonsäure und wird nachfolgend als SBP benannt. Die von der Firma Herbstreith & Fox angegebenen strukturellen Charakteristika sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alle Pektine wurden nach Erhalt unter Lichtausschluss bei -40 °C gelagert.

Tabelle 1: Bezeichnung der kommerziellen Pektine sowie von der Firma Herbstreith & Fox GmbH & Co. KG angegebenen strukturelle Strukturcharakteristika. GalA: Galacturonsäure, DM: Methylierungsgrad, M_w : mittleres Molekulargewicht

	Classic C	Classic CU901	Classic CU902	Classic A	Herbapekt SF 50-LV	Betapec RU 301
Abkürzung	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP
Herkunft	Citrus	Citrus	Citrus	Apfel	Apfel	Zuckerrübe
GalA-Anteil [%]	90	91	81	78	82	65
DM [%]	60	7	7	61	57	54
M_w -Bereich [kDa]	mittel (70-90 kDa)	niedrig (bis 15 kDa)	mittel (70-90 kDa)	mittel (70-90 kDa)	niedrig (bis 15 kDa)	niedrig- mittel

3.2. LABORTECHNISCHE EXTRAKTION DER PEKTINE

3.2.1. Ausgangsmaterialien

Wie in Kapitel 1.2. beschrieben, eignet sich eine Vielzahl an Industrienebenströmen zur Isolierung von Pektinen. Um eine mögliche Anwendung in der Industrie zu gewährleisten, wurde für die labortechnische Gewinnung der Pektine auf die quantitativ bedeutendsten Rohstoffe Apfeltrester und Citrusschalen zurückgegriffen, welche beide von der Firma Herbstreith & Fox bezogen wurden. Die Ausgangsmaterialien wurden anschließend bis zum Einsatz unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert.

3. Material und Methoden

3.2.2. Optimierung der Extraktionsparameter

Um eine große Breite an strukturell unterschiedlichen Pektinen abzudecken, sollte bei der Herstellung der labortechnischen Pektine ein Erhalt der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane im Fokus stehen. Anhand der in Kapitel 1.2. beschriebenen Erkenntnisse aus früheren Studien wurden einige Parameter für alle Extraktionsverfahren gleich gewählt. So wurden die Rohstoffe vor ihrem Einsatz auf einen Partikeldurchmesser von 2 mm vermahlen und standardmäßig ein Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis von 1:25 gewählt. Die Extraktionen wurden unter sauren Bedingungen bei 95 °C durchgeführt und das resultierende Extrakt mittels Zentrifugation und mehrmaligem Waschen von den Feststoffen abgetrennt. Um die polymeren Pektinstrukturen von Mono- und Oligosacchariden sowie weiteren alkohollöslichen Stoffen zu separieren, wurden sie durch Zugabe des zweifachen Volumens an Ethanol präzipitiert. Die Pektine wurden anschließend über ein von der Firma Herbstreith & Fox zur Verfügung gestelltes robustes Filtertuch von der Flüssigkeit abgetrennt und über mehrere Waschschriffe von möglichen eingeschlossenen Strukturen befreit. Die Trocknung erfolgte zunächst im Abzug und schließlich bei 50 °C im durchlüftenden Trockenschrank. Alle Pektine wurden im trockenen Zustand auf einen Partikeldurchmesser von < 0,5 mm gemahlen und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert. Variablen bei der Optimierung der Pektinextraktion stellten das eingesetzte Extraktionsmittel, dessen pH-Wert sowie die Dauer des Extraktionsprozesses dar. Für eine möglichst hohe Ausbeute sollten die Pektine zugänglicher und damit besser solubilisierbar gemacht werden, was durch ein partielles Vorquellen der Ausgangsmaterialien im Extraktionsmittel sowie durch enzymunterstützte Verfahren realisiert werden sollte.

Für die in Kapitel 3.4. beschriebenen Fermentationsversuche wurde von jedem der drei eingesetzten labortechnisch extrahierten Pektine etwa 1 kg Material benötigt, weshalb drei ausgewählte Extraktionsprotokolle auf einen größeren Maßstab angepasst wurden. Um dabei Lösungsmittel einzusparen, wurden die Extrakte vor der Präzipitation auf etwa ein Drittel ihres Volumens eingeeengt. So wurden ein Apfelpektin (im Folgenden AP.L) und zwei Citruspektine (CP-L1 und CP-L2) gewonnen und für die weiteren Versuche verwendet. Die eingesetzten Extraktionsverfahren sind in Kapitel 4.1. und Kapitel 8.1. detailliert beschrieben.

3.3. STRUKTURCHARAKTERISIERUNG DER PEKTINE

3.3.1. Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Pektine umfassen wie in Kapitel 1.1.3. beschrieben eine strukturell diverse und hochkomplexe Gruppe an Polysacchariden, welche aus verschiedenen Struktureinheiten aufgebaut sind. Aufgrund der komplexen Struktur ist eine ganzheitliche Betrachtung der intakten Polysaccharide allerdings nahezu unmöglich. Durch Bestimmung der charakteristischen Monosaccharide der

3.3. Strukturcharakterisierung der Pektine

einzelnen Struktureinheiten in den Pektinen ist es möglich, über deren Verteilung einen ersten Eindruck zur makromolekularen Struktur der Pektine zu erlangen und so beispielsweise das Verhältnis von Homogalacturonanen zu Typ I Rhamnogalacturonanen abzuschätzen. Außerdem können Rückschlüsse auf weitere möglicherweise co-extrahierte Zellwandpolysaccharide gezogen werden. Dafür müssen zunächst die glykosidischen Bindungen im Polymer gespalten werden, um die Monosaccharide für eine anschließende (semi-)quantitative Erfassung freizusetzen. Dies erfolgt je nach Probenmaterial meist durch saure Hydrolysen unter variierenden Bedingungen.

Saeman und Mitarbeitende entwickelten dafür ein zweistufiges Verfahren unter dem Einsatz von Schwefelsäure (Saeman *et al.* 1945). Dadurch wurde die Miterfassung von kristalliner Cellulose sowie celluloseassoziiertes Xyloglucane und weiterer schwer zugänglicher Strukturen ermöglicht. Allerdings kann es gleichzeitig zu einer Unterbestimmung von Desoxyzuckern wie Rhamnose kommen. Zusätzlich werden durch Schwefelsäure die stabilen glykosidischen Bindungen zwischen Uronsäuren nicht vollständig gespalten, weshalb deren Freisetzung und somit deren Mitbestimmung begrenzt ist (De Ruiter *et al.* 1992; Willför *et al.* 2009). Um dennoch Pektinstruktureinheiten hydrolytisch repräsentativ erfassen zu können, wurde eine Methanolyse durchgeführt, deren Eignung zur Hydrolyse löslicher uronsäurehaltiger Strukturen in früheren Studien gezeigt werden konnte. Gleichzeitig war ein Abbau freigesetzter Galacturonsäureeinheiten in lediglich geringem Maße zu beobachten (De Ruiter *et al.* 1992; Willför *et al.* 2009). Die Umsetzung der Polysaccharide erfolgt dabei mit methanolischer Salzsäure und resultiert in der Bildung von Methylglykosiden. Um diese als Monosaccharide zu erfassen, kann wiederum eine Hydrolyse mittels Trifluoressigsäure (*Trifluoroacetic Acid*, TFA) unter Abspaltung der Methylgruppe durchgeführt werden (De Ruiter *et al.* 1992). Eine Erfassung kristalliner Cellulose ist hierbei jedoch nicht möglich, weshalb sich die Methode überwiegend für lösliche und cellulosefreie Strukturen eignet. Die detaillierten Vorgehensweisen beider Hydrolysemethoden sind im Kapitel 8.2.1. beschrieben.

Für die Auftrennung und Detektion der freigesetzten Monosaccharide gibt es verschiedene Möglichkeiten, wobei sich die Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (*High Performance Anion Exchange Chromatography*, HPAEC) in Verbindung mit einem gepulst amperometrischen Detektor (*Pulsed Amperometric Detector*, PAD) als gut geeignet für die Analyse von underivatisierten Kohlenhydraten erwiesen hat (Lee 1990). Der anionische Charakter der Monosaccharide wird dabei durch das stark basische Milieu (pH 12,0 - 13,5) hervorgerufen. Aufgrund ihrer Eigenschaft als schwache Säuren liegen auch neutrale Monosaccharide unter diesen Bedingungen dissoziiert und somit negativ geladen vor. So können sie mit den quartären Ammoniumionen der stationären Phase interagieren und werden durch ionische Wechselwirkungen retardiert. Als Elutionsmittel dient dabei verdünnte Natronlauge, welche bei höherer Ionenstärke die Elution der Monosaccharide bedingt. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen

3. Material und Methoden

späteren Elutionszeiten und einer höheren Säurestärke der Monosaccharide hergestellt werden (Paskach *et al.* 1991). So können beispielsweise die Stereoisomere Mannose und Glucose trotz ihrer ähnlichen Struktur anhand ihrer unterschiedlichen Säurestärken ionenchromatographisch aufgetrennt werden (Lee 1996). Bei Uronsäuren sind die ionischen Wechselwirkungen durch die zusätzlich dissoziiert vorliegende Säuregruppe weit höher als bei Neutralzuckern. Daher ist für deren Miterfassung ein stärkeres Elutionsmittel notwendig, wofür meist Natriumacetatlösungen verwendet werden. Ein Nachteil der HPAEC-basierten Auftrennung der Monosaccharide unter alkalischen Bedingungen ist die Verseifung möglicher, nicht bereits durch die saure Hydrolyse abgespaltener Acetyl- und Methylveresterungen der Galacturonsäure- und/oder Rhamnoseeinheiten. Damit verbunden ist ein Informationsverlust über die native Struktur der Pektine. Die Detektion der Monosaccharide erfolgt an der Goldelektrode des PADs, wo diese durch das Anlegen eines positiven Potentials teilweise oxidiert werden und dadurch einen messbaren Stromfluss erzeugen. Durch die Oxidation der Analyten kann es zu einer Ablagerung von Oxidationsprodukten auf der Goldelektrode kommen, welche durch das Anlegen eines höheren positiven Potentials entfernt werden. Ein negatives Potential sorgt schließlich für die Reduktion des zuvor entstandenen Goldoxids zu Gold, wodurch die Elektrode wieder regeneriert wird. Diese Potentialabfolge läuft zyklisch innerhalb kürzester Zeit ab und ermöglicht so in Kombination mit der HPAEC-basierten Auftrennung eine sensitive und selektive Analytik von Kohlenhydraten. Das erzeugte, konzentrationsabhängige Detektorsignal kann je nach Monosaccharid unterschiedlich ausfallen. Zusätzlich kann der Response durch kleine Änderungen im pH-Wert des Eluenten beeinflusst werden. Aus diesen Gründen wird für die (semi-)quantitative Bestimmung von Monosacchariden meist eine Kalibrierung mit Standardsubstanzen benötigt.

Als alternative Methode zur Analyse der freigesetzten Monosaccharide können gaschromatographische (GC) Verfahren durchgeführt werden (Albersheim *et al.* 1967; Willför *et al.* 2009). Aufgrund der Vielzahl an intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen weisen diese allerdings einen sehr hohen Siedepunkt auf. Um eine GC-basierte Analyse zu ermöglichen, müssen die Monosaccharide daher zunächst zeitaufwändig derivatisiert werden, um so deren Flüchtigkeit zu erhöhen. Dafür haben sich insbesondere die Umsetzung zu Alditolacetaten oder Trimethylsilylether als geeignet erwiesen (Albersheim *et al.* 1967; Davison und Young 1969). Für die Miterfassung der Uronsäuren muss je nach Derivatisierungsmethode teilweise eine zusätzliche Reduktion der Carboxygruppe erfolgen (vgl. Kapitel 3.3.2.). Eine (semi-)quantitative Bestimmung mittels massenspektrometrischer Detektion (MS) oder Flammenionisationsdetektion (FID) kann aufgrund der robusten GC-basierten Analytik unter Einbeziehen charakteristischer Responsefaktoren erfolgen (Melton und Smith 2001). Zusätzlich kann für die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung das quantitative zweidimensionale (2D) *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) Kernspinresonanz- (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR-) spektroskopische Experiment verwendet werden (vgl. Kapitel 3.6.). Auch hier

muss nach der Hydrolyse eine weitere Probenaufarbeitung erfolgen, welche sich jedoch als weniger zeitintensiv erwiesen hat. Im Gegensatz zu den beiden anderen Methoden werden hier separate Signale für die α - und β -Anomere durch Mutarotation sowie für die Furanose- und Pyranoseformen einzelner Monosaccharide erzeugt (Sasaki *et al.* 2014).

Aufgrund der Möglichkeit zur selektiven und sensitiven Detektion sowie der direkten und im Arbeitskreis etablierten Methodik wurde sich für eine Analyse der säurehydrolytisch freigesetzten Monosaccharide mittels HPAEC-PAD entschieden. Die detaillierten Parameter sind in Kapitel 8.2.1. beschrieben.

3.3.2. Bestimmung der Bindungsverhältnisse in den Polysacchariden

Um weitere Informationen über den makromolekularen Aufbau der Polysaccharide zu erlangen, ist es möglich, die Bindungstypen der unterschiedlichen Monosaccharide innerhalb des Polymers zu bestimmen. Über charakteristische glykosidische Bindungen können Rückschlüsse auf das Vorhandensein und den Anteil der unterschiedlichen Struktureinheiten in den Pektinen geschlossen werden. Außerdem ist eine Abschätzung der Länge und/oder des Verzweigungsgrades der neutralen Seitenketten und des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane möglich.

Eine etablierte Methode zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharide in Polymeren stellt die Methylierungsanalyse dar. Der Erhalt der Informationen über die Verknüpfungsstellen wird dabei über eine schrittweise Markierung der Monomereinheiten ermöglicht (vgl. Abbildung 5). In der Literatur wurden dafür zahlreiche Varianten beschrieben, welche sich überwiegend in der Auswahl der Reagenzien und Reaktionsbedingungen unterscheiden, während das zugrundeliegende Prinzip gleichbleibend ist. Da Uronsäureeinheiten sehr starke glykosidische Bindungen ausbilden, werden diese unter den nachfolgend beschriebenen Hydrolysebedingungen nicht quantitativ erfasst. Daher ist für deren Mitbestimmung eine Aktivierung der Carboxygruppe mit beispielsweise Carbodiimid und eine anschließende Reduktion notwendig. Eine etablierte Methode von Kim und Carpita ermöglicht dabei die Umsetzung der Uronsäuren mit Natriumborodeuterid in ihre entsprechenden 6,6'-dideutერიerten Neutralzucker. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, über eine schrittweise Reduktion zwischen methylierten und unmethylierten Carboxygruppen zu unterscheiden (Kim und Carpita 1992).

Nach einer möglichen Reduktion der Uronsäuren erfolgt die Methylierung der frei vorliegenden Hydroxygruppen in den Polymeren, wofür das Material zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wird. Um die Zugänglichkeit von schwerlöslichem Material zu verbessern, kann ein Quellen des Probenmaterials in DMSO über Nacht erfolgen. Die anschließende Zugabe einer starken Base wie Methylsulfinyl-Carbanion oder frisch gemörsertes Natriumhydroxid resultiert in einer Deprotonierung der ungebundenen Hydroxygruppen in den Polysacchariden, welche durch die Umsetzung mit Methyljodid methyliert werden (Hakomori 1964; Ciucanu und Kerek 1984). Bevorzugt wird dabei der Einsatz von Natriumhydroxid, da geringere Anteile an Nebenprodukten

3. Material und Methoden

gebildet werden. Um eine mögliche Untermethylierung zu reduzieren, kann eine Wiederholung des Methylierungsschrittes durchgeführt werden (Pettolino *et al.* 2012). Im Anschluss werden die glykosidischen Bindungen beispielsweise mittels TFA hydrolytisch gespalten, woraus ein Informationsverlust über die anomere Konfiguration (α/β) der Monosaccharide resultiert. Durch die anschließende Reduktion der freigesetzten partiell methylierten Monosaccharide mit Natriumbordeuterid erfolgt eine gleichzeitige Ringöffnung und Markierung des anomeren C-Atoms (C-1) mit Deuterium. Die bei der Spaltung der glykosidischen Bindungen sowie der Ringöffnung freigesetzten Hydroxygruppen werden schließlich mit Essigsäureanhydrid unter Verwendung von 1-Methylimidazol als Katalysator acetyliert (Blakeney *et al.* 1983). Dies bedingt eine Erhöhung der Flüchtigkeit, sodass die gebildeten partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) mittels GC-basierten Methoden analysiert werden können. Die Zuordnung der PMAA kann nach GC-MS Analyse über die Elutionsreihenfolge und den Vergleich der charakteristischen Massenspektren mit Datenbanken und Literaturquellen erfolgen (CCRC 2007; Sasaki *et al.* 2005; Sims *et al.* 2018). Um eine Vergleichbarkeit zu garantieren, sind allerdings standardisierte Detektionsbedingungen notwendig. So erfolgt die Ionisierung der Analyten meist mittels Elektronenstoßionisation (EI) und einer kinetischen Energie der Elektronen von 70 eV (vgl. Kapitel 3.6.). Unter diesen Voraussetzungen findet beispielsweise eine bevorzugte Spaltung zwischen zwei Kohlenstoffmethylethern eines PMAA statt. Die Identifizierung von miterfassten Uronsäuren erfolgt über die Massenspektren der jeweiligen Neutralzucker, welche Fragmentationen höherer Massen ($[M^+ + 2]$) aufweisen (Pettolino *et al.* 2012). Über das Verhältnis von $[M^+]$ zu $[M^+ + 2]$ kann entsprechend das Verhältnis von Neutralzuckern zu Uronsäuren bestimmt werden. Nach der Zuordnung der unterschiedlich substituierten Monosaccharide kann mittels GC-FID Analyse unter Verwendung relativer Responsefaktoren auf Basis der sogenannten *Effective Carbon Response* Theorie eine semiquantitative Verteilung der PMAA ermittelt werden (Sweet *et al.* 1975).

Als weitere Modifikation der Methylierungsanalyse hat sich eine an die Methylierung angeschlossene Methanolyse gefolgt von einer Silylierung der partiell methylierten Monosaccharide als geeignet erwiesen. Auch hier kann die semiquantitative Bestimmung mittels GC-FID und den jeweiligen Responsefaktoren erfolgen. Im Anschluss an die Methanolyse liegen die freigesetzten Monosaccharide im Gleichgewicht als α - und β -Anomere vor. Zusätzlich können ursprünglich in Position O-4 und O-5 substituierte Monomere ihre Ringform (Furanose oder Pyranose) ändern. Nach der anschließenden Silylierung ist somit die Bildung von 2 bis 4 unterschiedlichen Produkten je substituiertem Monosaccharid möglich. Dies resultiert in hochkomplexen Chromatogrammen und einer möglichen Co-Elution verschiedener Analyten (Laine *et al.* 2002; Pettolino *et al.* 2012). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Methylierungsanalyse unter der Bildung von PMAA durchgeführt. Da Galacturonsäureeinheiten in Pektinen überwiegend 1,4-substituiert vorliegen (vgl. Kapitel 1.1.3.), wurde die Reduktion der Carboxygruppen lediglich in Einzelfällen

3.3. Strukturcharakterisierung der Pektine

durchgeführt. Die detaillierte Arbeitsvorschrift und die chromatographischen Bedingungen sind in Kapitel 8.2.2. beschrieben.

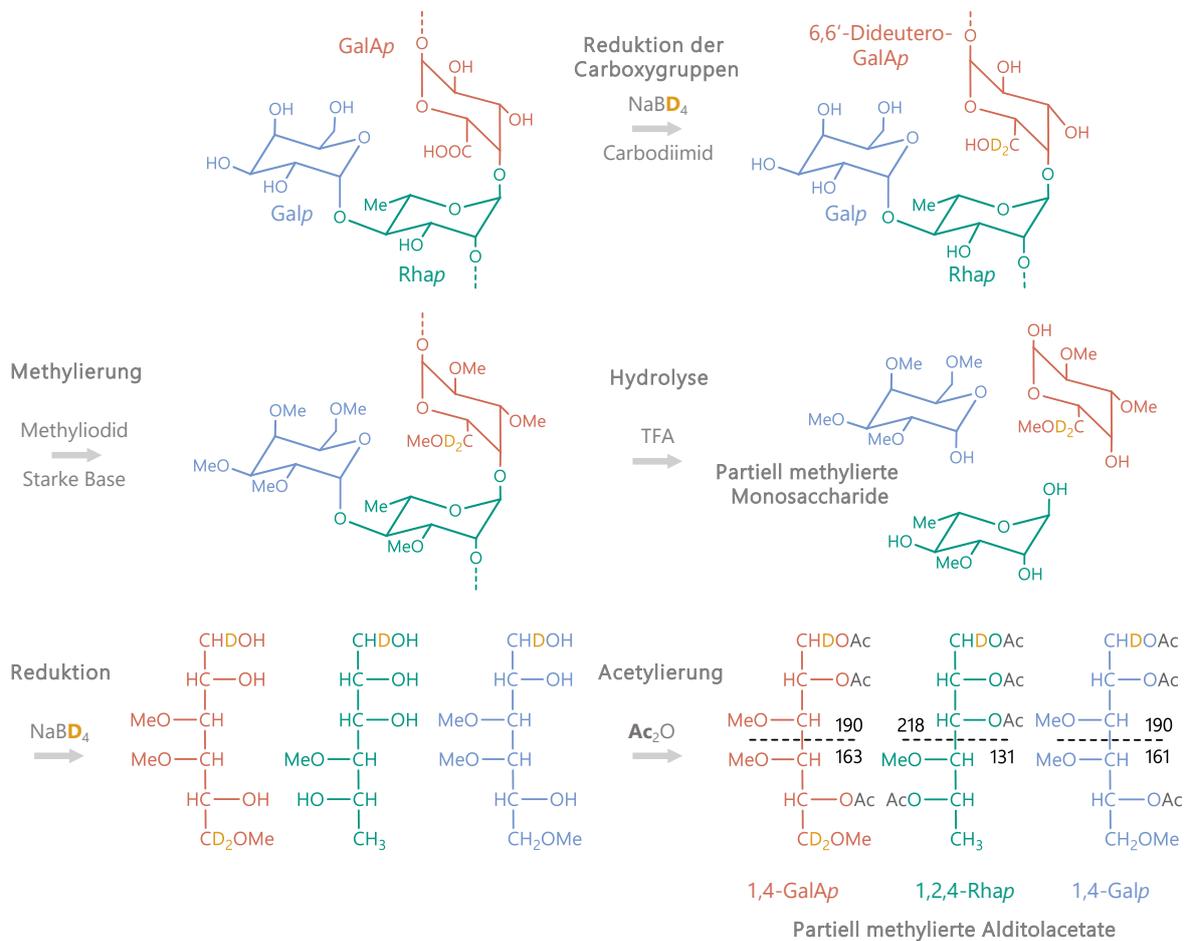


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs der Methylierungsanalyse inklusive Reduktion der Carboxygruppen eines Abschnitts der Typ I Rhamnogalacturonane. Zusätzlich ist die Bildung der Primärfragmente bei gaschromatographischer Analyse mit massenspektrometrischer Detektion (70 eV) der resultierenden partiell methylierten Alditolacetate in schwarz dargestellt. Ac: Acetylgruppe, Ac_2O : Essigsäureanhydrid, f: Furanose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, NaBD_4 : Natriumbor-deuterid, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, TFA: Trifluoressigsäure

Eine weitere Möglichkeit zur näheren Betrachtung der Feinstruktur von Pektinen ist die gezielte enzymatische Spaltung glykosidischer Bindungen unter Freisetzung charakteristischer Struktureinheiten. Dabei gibt es verschiedene Ansätze, welche unterschiedliche Ziele verfolgen. In einer Profilingmethode von Wefers und Bunzel werden die linearen α -(1→5)-glykosidischen Verknüpfungen der Arabinane bzw. das β -(1→4)-glykosidisch verknüpfte Rückgrat der Typ I (Arabino-)Galactane unter dem Einsatz von *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase enzymatisch hydrolysiert. Da die Enzyme durch Substituenten am linearen Rückgrat sterisch gehindert werden und sie (fast) ausschließlich die beschriebenen Bindungen spalten können, werden charakteristische Oligosaccharide freigesetzt. So ist eine Vielzahl linearer und unterschiedlich verzweigter Arabinooligosaccharide beschrieben (vgl. Abbildung B 1 im Anhang), deren variierende Anteile unter anderem Rückschlüsse auf die Verteilung und Art der Seitenketten in den Arabinanen erlauben. Außerdem können strukturelle Besonderheiten wie eine terminal

3. Material und Methoden

gebundene Xylopyranoseeinheit an einer Arabinofuranose nachgewiesen werden. Durch eine gering ausgeprägte Arabinofuranosidase-Nebenaktivität konnte allerdings auch die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden (Wefers und Bunzel 2016a).

Bei der Profilingmethode der Typ I (Arabino-)Galactane sind lediglich lineare Hydrolyseprodukte beschrieben, wobei die Galactoseeinheiten teilweise intern oder terminal mit Arabinopyranoseeinheiten verknüpft vorliegen. Durch eine unvollständige Hydrolyse kann es auch hier zur Bildung von Nebenprodukten kommen (Wefers und Bunzel 2016a). Insgesamt ist bei der Methode zu beachten, dass bei Pektinen enzymatisch unzugängliche Strukturen vorliegen können und die Oligosaccharide somit nicht vollständig repräsentativ für die ganzheitlichen Arabinane und Typ I (Arabino-)Galactane sind. Die freigesetzten Strukturen können über unterschiedliche Methoden wie 2D HSQC-NMR- oder HPAEC-PAD-basierte Verfahren analysiert werden. Für die Aufstellung der semiquantitativen Verteilung sind für beide Methoden relative Responsefaktoren ermittelt worden (Wefers und Bunzel 2016b, 2016a). Aufgrund der im Arbeitskreis etablierten Methode und den in Kapitel 3.3.1. beschriebenen Vorteilen wurde sich für eine Analyse der Arabinan- und Typ I (Arabino-)Galactan oligosaccharide mittels HPAEC-PAD entschieden (vgl. Kapitel 8.2.3.).

Ein weiterer enzymatischer Ansatz zur Charakterisierung der Feinstruktur setzt am Abbau ganzer Pektinstruktureinheiten an. So wird beispielsweise eine Freisetzung des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane von Erbsenpektinen erreicht, indem die Homogalacturonane und Xylogalacturonane sowie die neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane über verschiedene, teilweise rekombinant gewonnene Enzyme abgebaut werden. Entsprechend dieses Prinzips war unter anderem die separate Betrachtung von Typ I Rhamnogalacturonanen, Homogalacturonanen und Xylogalacturonanen möglich. Durch umfassende Analysen konnten so einerseits die Verhältnisse der verschiedenen Struktureinheiten zueinander ermittelt werden. Andererseits war eine Betrachtung der Verzweigungen innerhalb der neutralen Seitenketten sowie im Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane möglich (Noguchi *et al.* 2020). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die strukturell komplexen Pektine meist nicht vollständig enzymatisch erfasst werden können. Da im Arbeitskreis die benötigten rekombinanten Enzyme nicht vorhanden sind, wurde auf diese Charakterisierung der Pektinfeinstruktur verzichtet.

3.3.3. Bestimmung des Methylierungs- und Acetylierungsgrads der polymergebundenen Galacturonsäure

Sowohl DM als auch DAc haben einen Einfluss auf die Eigenschaften sowie die Fermentation von Pektinen (vgl. Kapitel 1.3. und 1.4.). Aus diesem Grund ist der Anteil an galacturonsäuregebundenen Methyl- und Acetylgruppen ein wichtiger Faktor für die Charakterisierung von Pektinen. Bei dem titrimetrischen Verfahren des *Food Chemical Codex* ist die Bestimmung des Galacturonsäuregehalts und des DMs innerhalb einer Analyse möglich. Dafür wird das gelöste

3.3. Strukturcharakterisierung der Pektine

Material zunächst mit Phenolphthalein als Indikator gegen Natronlauge titriert, wobei die freien Carboxygruppen in Pektinen erfasst werden. Eine anschließende Umsetzung mit höher konzentrierter Natronlauge resultiert in der Verseifung der Methylgruppen und so in einer Freisetzung der zuvor methylierten Carboxygruppen. Nach einer Neutralisierung mit der adäquaten Menge an Salzsäure können die freigesetzten Carboxygruppen wiederum gegen Natronlauge titriert werden. Durch das Verhältnis des benötigten Volumens an Natronlauge zwischen dem ersten und dem zweiten Titrationsschritt ist der DM der Galacturonsäureeinheiten in Pektinen bestimmbar (Food Chemical Codex 1972). Diese Methode für die Bestimmung des DMs ist in der Industrie weit verbreitet. Aufgrund der großen benötigten Probenmenge von 5 g wird sie allerdings im Labormaßstab nur selten angewandt. Außerdem kann es unter anderem durch Matrixbestandteile zu Verfälschungen der ermittelten Werte kommen. So führt der Verseifungsschritt zu einer Freisetzung von Essigsäure aus pektingebundenen Acetylgruppen. Diese wird bei dem zweiten Titrationsschritt miterfasst und führt zu einer Überbestimmung des DMs. Neben dieser Methode gibt es noch weitere unter anderem ^1H - oder ^{13}C -NMR-basierte Verfahren, bei welchen der Anteil an methylierter Galacturonsäure ohne Abbau der Pektinstrukturen bestimmt werden kann (Bédouet *et al.* 2003; Sinitsya *et al.* 1998). Unter anderem auflösungsbedingt sind die meist nur in geringen Anteilen in Pektinen vertretenen Acetylc Ester in ^1H -NMR-Spektren allerdings nur schlecht bestimmbar. Daher werden häufig Methoden angewandt, welche auf der getrennten Analyse des gesamten Galacturonsäuregehalts in Pektinen und den freisetzbaren Anteilen an Methanol und Essigsäure beruhen.

Für die quantitative Bestimmung des Galacturonsäuregehalts ist meist eine Hydrolyse der Polysaccharide notwendig. Dabei wird eine ausreichend starke Säure benötigt, sodass die Spaltung der vergleichsweise starken Bindung zwischen zwei Uronsäuren aber auch zwischen Uronsäuren und Neutralzuckern erfolgen kann. Da die freigesetzten Uronsäuren allerdings schnell decarboxyliert werden oder Lactone ausbilden können, kann eine prolongierte Hydrolyse je nach Quantifizierungsmethode zu deren Unterbestimmung führen. Verschiedene Verfahren zur Hydrolyse von Polysacchariden wurden bereits in Kapitel 3.3.1. beschrieben. Für die Freisetzung von Uronsäuren werden meist schwefelsaure Hydrolysemethoden verwendet, was neben der Spaltung der starken Bindungen unter anderem auf die Auflockerung der Matrix und die daraus resultierende verbesserte Zugänglichkeit der Uronsäuren zurückzuführen ist (Scott 1979). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass durch Kombinationsverfahren aus säurebasierter und enzymatischer Hydrolyse die Ausbeute an freigesetzter, intakter Galacturonsäure verbessert werden kann (Yapo 2012). Für die quantitative Bestimmung der freigesetzten Uronsäuren gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden, welche unter anderem auf GC- und hochleistungsflüssigkeitschromatographischen (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC-)Methoden beruhen (vgl. unter anderem Kapitel 3.3.1.). Zusätzlich sind colorimetrische Verfahren möglich, welche auf der photometrischen Bestimmung eines lichtabsorbierenden Chromophors beruhen.

3. Material und Methoden

Die Quantifizierung der Analyten erfolgt dabei über das Lambert-Beer'sche Gesetz, welches den Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration beschreibt. Die verschiedenen colorimetrischen Assays unterscheiden sich hauptsächlich in den eingesetzten Chromogenen, welche über unterschiedliche Reaktionen mit zumeist Kohlenhydratabbauprodukten in farbige Chromophore umgesetzt werden können. Bei schwefelsäurebasierten Verfahren wird meist der Abbau von Uronsäuren in ihre Furfuralderivate ausgenutzt. Diese können unter anderem mit Carbazol zu einem pink gefärbten Chromophor reagieren (Dische 1947). Für den resultierenden Farbstoff wurde allerdings gezeigt, dass dieser teilweise von Salzen unterdrückt werden kann und instabil gegenüber Hitze ist. Außerdem kann Carbazol mit Furfuralderivaten von Hexosen ebenfalls gefärbte Produkte bilden, was in einer Überbestimmung des Uronsäuregehalts resultieren kann (Bitter und Muir 1962). In dieser Arbeit wurde daher die colorimetrische Bestimmung von Galacturonsäure nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen durchgeführt. Dabei werden die Furfuralderivate der Uronsäuren mit 3-Phenylphenol als Chromophor unter der Bildung eines roten Farbkomplexes umgesetzt. Der dabei zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Bildung des Farbstoffs deutlich schneller, sensitiver und spezifischer abläuft als in bisher etablierten Methoden (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973). Dennoch kann eine Interferenz mit vorhandenen Neutralzuckern nicht ausgeschlossen werden, da diese ebenfalls in farbige Produkte umgesetzt werden können. Durch das Mitführen eines Blindwerts ist es allerdings möglich, den daraus resultierenden Fehler zu minimieren (Kintner und Buren 1982). Zusätzlich kann das Vorhandensein von beispielsweise Glucuronsäure in einer Überbestimmung des Galacturonsäuregehalts resultieren, da bei der beschriebenen Methode keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Uronsäuren möglich ist (Garna *et al.* 2006).

Die Bestimmung von DM und DAc basiert bei den meisten Methoden auf einer Verseifung der Esterbindungen, wobei Methanol und Essigsäure freigesetzt werden. Deren Konzentrationen können über verschiedene Verfahren bestimmt werden, wobei unter anderem HPLC- und GC-basierte Methoden Verwendung finden. So war eine Auftrennung und Detektion von Methanol und Essigsäure beispielsweise an einer Kationenaustauschersäule, einer C18-Säule oder an einer Ionenausschluss säule mit einem gekoppelten RI-Detektor möglich (Voragen *et al.* 1986; Levigne *et al.* 2002; Luzio und Cameron 2013). Bei allen genannten Methoden erwies sich der geringe Response von Methanol bei einer RI-Detektion als Problem. Außerdem kann die Co-Elution von Matrixbestandteilen in einer Verfälschung der Ergebnisse resultieren. Im Gegensatz dazu beruhen GC-basierte Verfahren meist auf der Analyse von Essigsäure und Methanol aus dem Dampfraum (*Headspace*), wobei eine Festphasenmikroextraktion (*Solid Phase Microextraction*, SPME) für verbesserte Ergebnisse sorgt (Savary und Nuñez 2003). Da bereits geringe Änderungen unter anderem der Temperatur oder des Gasraumvolumens in einer unterschiedlichen Adsorption an die SPME-Faser resultieren, muss für die Reproduzierbarkeit allerdings eine exakte Einhaltung der

3.3. Strukturcharakterisierung der Pektine

Bedingungen gewährleistet werden (Mester *et al.* 2001). Als eine einfache und robuste Methode zur Quantifizierung von Methanol und Essigsäure hat sich das ^1H -NMR-spektroskopische Verfahren von Müller-Maatsch und Mitarbeitenden erwiesen. Die Probe wird dabei in deuteriertem Lösungsmittel verseift und kann nach Filtration direkt bei Raumtemperatur vermessen und ohne zusätzliche Kalibrierung quantifiziert werden. Durch die Abtrennung der Polysaccharide wird eine isolierte Lage der Signale von Methanol und Essigsäure mit einer chemischen Verschiebung (δ) von $\delta = 3,4$ bzw. $\delta = 1,9$ im Hochfeld erreicht, wodurch deren empfindliche Detektion möglich ist (Müller-Maatsch *et al.* 2014). Durch das Verhältnis aus der Stoffmenge an Methanol bzw. Essigsäure zu der Stoffmenge an Galacturonsäure kann der DM bzw. DAc ermittelt werden. Die Methode hat sich dabei auch als geeignet für die reproduzierbare Quantifizierung geringer Mengen an Methanol oder Essigsäure erwiesen, was einen Vorteil gegenüber den genannten HPLC- und GC-Methoden darstellt. Daher wurde in dieser Arbeit die Methode nach Müller-Maatsch und Mitarbeitende (2014) für die Bestimmung des Methanol- und Essigsäuregehalts angewandt (vgl. Kapitel 8.2.4.).

3.3.4. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung und des Molekulargewichts

Die in Kapitel 1.1.3. beschriebenen Strukturparameter tragen allesamt zum Molekulargewicht der Pektine bei. Da Pektine aus unterschiedlichen Einheiten aufgebaut sind und diese Einheiten innerhalb der Pektine mit variierenden Kettenlängen und Strukturen auftreten können, ist eine Aussage über ein absolutes Molekulargewicht von Pektinen nicht möglich. Die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung lässt allerdings eine Einschätzung über die Größenverhältnisse in Pektinpräparaten zu. Außerdem können Veränderungen in der makromolekularen Struktur durch beispielsweise enzymatische oder *in vitro* Fermentationsansätze (vgl. Kapitel 3.4.) einfach gezeigt werden. Das zugrundeliegende Prinzip zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung ist die Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (*High Performance Size Exclusion Chromatography*, HPSEC) und die Trennung der gelösten Moleküle anhand ihres hydrodynamischen Volumens. Die stationäre Phase bei der HPSEC-basierten Trennung setzt sich aus porösen Polymeren zusammen. Diese erlauben Molekülen eines geringen hydrodynamischen Volumens ein Diffundieren in die Poren, woraus eine verlängerte Retentionszeit resultiert. Struktureinheiten eines größeren hydrodynamischen Volumens können dahingegen in geringerem Ausmaß in die Poren eindringen und weisen eine kurze Retentionszeit auf. Insgesamt ist so eine Auftrennung jener Moleküle möglich, welche aufgrund ihres hydrodynamischen Volumens in unterschiedlichem Ausmaß in vorhandene Poren eindringen können. Dabei kann aus stationären Phasen mit unterschiedlichen Porengrößen gewählt werden, sodass in Abhängigkeit des Analyten eine optimale Auftrennung erzielt wird. Neben der makromolekularen Struktur können jedoch unter anderem auch ionische Wechselwirkungen einen Einfluss auf das hydrodynamische

3. Material und Methoden

Volumen der Analyten haben und so die resultierende Molekulargewichtsverteilung verfälschen. So werden für polyanionische Polysaccharide wie Pektine häufig Puffer oder Salzlösungen (beispielsweise Natriumnitratlösungen) als Eluenten eingesetzt, um die Abstoßung zwischen den ionischen Gruppen zu minimieren (Churms 1996).

Zur anschließenden Detektion eignen sich je analytabhängig unterschiedliche Verfahren. So können bei ultraviolett-(UV-)aktiven Substanzen beispielsweise UV- oder Diodenarray-Detektoren eingesetzt werden, welche sich für underivatisierte Kohlenhydrate allerdings nicht eignen. Als geeigneter Detektor für die HPSEC-Analyse von Polysacchariden hat sich der RI-Detektor erwiesen. Vereinfacht ist dieser aus einer Referenzzelle, die den reinen Eluenten enthält, und einer Messzelle aufgebaut. Durch beide Zellen wird ein von einem Spalt fokussierter Lichtstrahl geführt, welcher durch eine Linse auf eine Fotomesszelle geleitet wird. Ist in beiden Zellen reiner Eluent enthalten, so erfolgt die Ankunft von Strahlung mit maximaler Intensität an einer bestimmten Position der Fotomesszelle. Sobald Analyt in den Detektor gelangt, verändert sich der Brechungsindex innerhalb der Messzelle und der Lichtstrahl wird abgelenkt. Dieser trifft so an anderer Position und mit geringerer Intensität der Strahlung auf die Fotomesszelle. Aus der resultierenden Differenz zu den Ausgangsbedingungen kann das Messsignal abhängig von der Konzentration des Analyten ermittelt werden. Bei gering konzentrierten oder verunreinigten Proben ist der RI-Detektor jedoch aufgrund seiner geringen Nachweisempfindlichkeit und seiner geringen Selektivität nicht geeignet. Zur Abschätzung des Molekulargewichts können zusätzlich Standardsubstanzen unterschiedlichen Molekulargewichts wie beispielsweise Dextran- oder Pullulanstandardsubstanzen injiziert werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass es sich bei den Standardsubstanzen um lineare Polysaccharide handelt und sich deren hydrodynamisches Volumen bei gleichem Molekulargewicht teilweise stark von dem der Pektine unterscheiden kann. Eine konkrete Abschätzung des Molekulargewichts kann durch den Einsatz verschiedener molekulargewichtsempfindlicher Detektoren erfolgen. Dabei können unterschiedlich definierte Molekulargewichte berechnet werden. Das zahlengemittelte Molekulargewicht (M_n) ist dabei der einfachste Wert und bezieht sich auf die Gesamtzahl an Molekülen. Beim gewichtsgemittelten Molekulargewicht (M_w) wird zusätzlich das Molekulargewicht der einzelnen Moleküle mit einbezogen (Sheu 2001). In der Industrie wird insbesondere auf die Bestimmung des viskositätsgemittelten Molekulargewichts (M_v) zurückgegriffen. Die Analyten können dabei auch ohne vorherige Auftrennung unter anderem durch Kapillarviskosimeter wie Ubbelohde-Kapillaren hinsichtlich ihrer Viskosität untersucht werden. Das dem zugrundeliegende Prinzip ist der Fluss der gelösten Probe durch eine Kapillare mit definierter Länge und definiertem Volumen. Anhand der benötigten Zeit für den Durchfluss der Kapillare kann die intrinsische Viskosität ermittelt werden, welche wiederum für die Berechnung des M_v benötigt wird (Kar und Arslan 1999). In Kombination mit dem Aufbau aus HPSEC und RI bietet sich dahingegen die Detektion und Bestimmung des M_w durch einen Mehrwinkellichtstreu- (*Multi-Angle Light Scattering*, MALS-)

3.3. Strukturcharakterisierung der Pektine

Detektor an. Das zugrundeliegende Prinzip beruht auf der Streuung von Licht durch die gelösten Analyten. Dafür wird eine Lichtquelle, meist ein Laser, durch den Eluenten geleitet und die resultierende Streuung des Lichts gemessen. Dies erfolgt zeitgleich an mehreren Winkeln zwischen $> 0^\circ$ und $< 180^\circ$ und wird zunächst für den reinen Eluenten bestimmt. Durch den gelösten Analyten erfolgt je nach Struktur eine unterschiedlich abweichende Lichtstreuung. Die Messwerte an den verschiedenen Winkeln ermöglichen zusammen mit unter anderem der Konzentration der Probe die Berechnung des M_w . Bei dieser Berechnung fließt das Brechungsindexinkrement (dn/dc) als probenspezifische Variable stark in das resultierende Molekulargewicht mit ein (Wyatt 2021). Dieser Wert wird als konzentrationsabhängige Änderung des Brechungsindex definiert und kann sich je nach Struktur auch innerhalb einer Polysaccharidklasse stark unterscheiden. Häufig werden für das dn/dc Literaturwerte eingesetzt, was in Fehlern der ermittelten Molekulargewichte resultieren kann.

Die verschiedenen beschriebenen Molekulargewichte wie M_w und M_n resultieren aufgrund ihrer unterschiedlichen Definitionen in abweichenden Werten. So sind die Molekulargewichte untereinander nicht gut vergleichbar. Die einzelnen Methoden eignen sich jedoch gut, um verschiedene Analyten hinsichtlich ihres Molekulargewichts relativ zueinander einzuordnen. In dieser Arbeit wurde dafür eine HPSEC-RI/MALS-basierte Analyse zur Ermittlung des M_w sowie der Molekulargewichtsverteilung verwendet (vgl. Kapitel 8.2.5.).

3.3.5. Bestimmung des Anteils an Nicht-Pektinkomponenten

Bei der Gewinnung von Pektinen kann es zu einer Co-Extraktion verschiedener nicht-Pektinkomponenten kommen. Dabei ist je nach vorliegendem pH-Wert unter anderem eine Assoziation positiv geladener Ionen an die dissoziierten Säuregruppen der Galacturonsäureeinheiten möglich, was somit insbesondere bei niedrigmethylierten Pektinen von Bedeutung ist. Zusätzlich können Salze von der makromolekularen Struktur der Pektine während der Präzipitation eingeschlossen bzw. mit ausgefällt werden und so den tatsächlichen Anteil an Pektinen an der Gesamtmasse des Extraktes verfälschen. Um den Anteil an mineralischen Komponenten in Pektinen zu bestimmen, kann eine Veraschung der Proben durchgeführt werden. Dabei werden bei hohen Temperaturen meist ab 500°C im Zuge einer Pyrolysereaktion die organischen Bestandteile zersetzt, sodass die Asche mit den enthaltenen Mineralien als fester Rückstand resultiert. Für den säureunlöslichen Ascheanteil, wie er laut Verordnung (EU) Nr. 231/2012 für kommerziell eingesetzte Pektine bestimmt werden muss, wird die erhaltene Asche wiederum in Salzsäure suspendiert und der übrige Feststoff quantifiziert (VO (EU) Nr. 231/2012).

Zusätzlich kann es zu einer Co-Extraktion von Proteinen kommen, was insbesondere auf stark assoziierte Arabinogalactanproteine und weitere Strukturproteine zurückgeführt werden kann. Um die enthaltenen Proteine zu quantifizieren, wird bei den meisten Methoden zunächst der Stickstoffgehalt bestimmt. Die Freisetzung des Stickstoffs aus pflanzlichem Probenmaterial erfolgt

3. Material und Methoden

dabei häufig durch einen Kjeldahl-Aufschluss, bei welchem organischer Kohlenstoff durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure zu Kohlenstoffdioxid oxidiert wird. Gleichzeitig findet eine Reduktion des organischen Stickstoffs zu Ammonium(sulfat) und dessen Solvatisierung in Schwefelsäure statt. Für eine schnellere Umsetzung des Materials werden selen-, kupfer- oder titanhaltige Oxidationsmittel als Katalysatoren eingesetzt (Kjeldahl 1883). Dennoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund des vergleichsweise niedrigen Siedepunkts der Schwefelsäure stark durch die Aufschlusstemperatur limitiert. Durch den Einsatz von Kalium- oder Natriumsulfat ist eine Erhöhung der Siedetemperatur des Reaktionsgemischs und so eine schnellere Umsetzung des organischen Materials zu realisieren (Bradstreet 1954).

Die Quantifizierung des Stickstoffs kann über verschiedene Methoden erfolgen, wobei unter anderem die Titration von mit Borsäure komplexiertem Ammoniak gegen Salzsäure möglich ist. Für diese Methode werden allerdings große Mengen an Stickstoff und damit auch an Probenmaterial benötigt (Reardon *et al.* 1966). Eine empfindlichere Methode stellen kolorimetrische Verfahren wie beispielsweise eine salicylatbasierte Umsetzung des Ammoniumsulfats dar (Willis *et al.* 1996). Zusätzlich kann die Erfassung des Stickstoffgehalts über eine ammoniaksensitive Elektrode erfolgen (McKenzie und Young 1975; Urvat *et al.* 2019). Dafür wird das gelöste Ammoniumsulfat durch die Neutralisation der Schwefelsäure mit einer starken Base als Ammoniak freigesetzt und kann so durch die Elektrode erfasst und der Stickstoffgehalt berechnet werden. Nachteilig bei der Freisetzung des Stickstoffs durch den Kjeldahl-Aufschluss ist der Einsatz von konzentrierter Schwefelsäure und schwermetallhaltigen Katalysatoren. Ein Alternativverfahren dazu stellt die Dumas Methode dar, welche auf die Verwendung korrosiver und toxikologisch relevanter Substanzen verzichtet. Sie beruht auf einer Verbrennung des Materials bei 800 - 1000 °C und einer damit einhergehenden Umsetzung des enthaltenen Stickstoffs in Stickoxide. Nach deren Reduktion zu freiem Stickstoff ist eine Quantifizierung mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor möglich (Jung *et al.* 2003). Diese Methode erfasst im Gegensatz zum Kjeldahl-Aufschluss nicht nur überwiegend organischen, sondern auch anorganischen Stickstoff, was zu einer Überbestimmung des Proteinanteils führen kann (Simonne *et al.* 1997). Für die anschließende Berechnung des Proteingehalts aus dem quantitativ bestimmten Stickstoff wird häufig der Faktor 6,25 verwendet, welcher auf der Annahme beruht, dass Proteine durchschnittlich einen Stickstoffgehalt von 16 % aufweisen (Mariotti *et al.* 2008). Aufgrund der diversen Zusammensetzung der Proteine ist dieser Faktor allerdings nicht auf alle Lebensmittel und proteinhaltigen Materialien anwendbar. Für die Bestimmung des spezifischen Umrechnungsfaktors ist eine Ermittlung der jeweiligen Aminosäurezusammensetzung notwendig. Dabei wurde in der Literatur für hochmethyliertes Apfelpektin beispielsweise ein Faktor von 6,38 und für Citruspektine ein Bereich von 6,24 bis 6,37 beschrieben (Anderson *et al.* 1987).

In dieser Arbeit wurde der Proteinanteil aufgrund der etablierten Methode nach Kjeldahl-Aufschluss mit ammoniaksensitiver Elektrode und einem Umrechnungsfaktor von 6,25 bestimmt. Die Vorgehensweisen der quantitativen Asche- und Proteinbestimmung sind in Kapitel 8.2.6. und Kapitel 8.2.7. beschrieben.

3.4. FERMENTATIONSVERSUCHE

Um die Fermentationskinetik der unterschiedlichen Struktureinheiten im Pektin zu untersuchen, wurden verschiedene Fermentationsansätze gewählt, welche sich in *in vitro* und *in vivo* Studien aufteilen. Dafür wurden jeweils einzelne oder alle der beschriebenen Pektine eingesetzt. Je nach Studiendesign wurden dabei unterschiedliche Ziele verfolgt, welche im Folgenden beschrieben werden.

3.4.1. Enzymatische Fermentation

Viele der kommerziell erhältlichen Enzympräparate spalten Zellwandpolysaccharide mechanistisch vergleichbar zu den im humanen Kolon vertretenen bakteriellen Enzymen. So können diese genutzt werden, um Rückschlüsse auf mögliche im Verlauf der mikrobiellen Fermentation intermediär gebildete Spaltprodukte zu erlangen. Da an der kolonalen Umsetzung der Pektine eine Vielzahl an bakteriellen Enzymen beteiligt ist (vgl. Kapitel 1.4.1.), ist für einen solchen Ansatz insbesondere die Verwendung von Multienzympräparaten geeignet. So kann beispielsweise das Enzymgemisch Driselase eingesetzt werden, für welches vom Hersteller kohlenhydratspezifische Enzyme wie Cellulasen und Laminarinasen beschrieben wurden. Fry zeigte außerdem Galactosidase- und Galactanase-Aktivitäten, welche allerdings durch frei vorliegende Galactoseeinheiten teilweise inhibiert wurden (Fry 1983). Zusätzlich konnten unter anderem Arabinofuranosidase-, α -Rhamnosidase- und *endo*-Rhamnogalacturonase-Aktivitäten nachgewiesen werden, welche insbesondere für die Umsetzung der Typ I Rhamnogalacturonane wichtig sind (Ishii 1997; Wefers und Bunzel 2016a; Ferreira-Lazarte *et al.* 2018). Beim Einsatz von Driselase zur Spaltung makromolekularer Pektine konnte zusätzlich die Freisetzung von acetylierten Oligosacchariden der Homogalacturonane und der Typ I Rhamnogalacturonane gezeigt werden (Ishii 1995, 1997). Eine weitere Studie realisierte die Driselase-katalysierte Freisetzung von monomeren Rhamnose- und Galacturonsäureeinheiten aus dem Rückgrat von Typ I Rhamnogalacturonanen nach vorheriger Verseifung der Acetate. So konnte gezeigt werden, dass durch Veresterung der Galacturonsäureeinheiten mit Essigsäure die Zugänglichkeit von einer oder mehreren benachbarten glykosidischen Bindungen für Driselase gehindert wird und diese folglich nicht weiter gespalten werden können (Perrone *et al.* 2002). Die nachgewiesene Methylesterase-Aktivität von Driselase spielt in der genannten Studie aufgrund des Einsatzes von Typ I Rhamnogalacturonanen und der darin selten auftretenden Veresterung der Galacturonsäureeinheiten mit Methanol (vgl. Kapitel 1.1.3.2.) eine untergeordnete Rolle (Brown und Fry 1993;

3. Material und Methoden

Perrone *et al.* 2002). Für den Einsatz bei Pektinen kann die enzymatische Methylesterase-Aktivität allerdings durchaus von Bedeutung sein. Zusätzlich dazu war es Tsumuraya und Mitarbeitenden möglich, eine β -(1 \rightarrow 3)-D-Galactanase-angereicherte Enzymfraktion aus Driselase zu isolieren. Mit dieser konnte die hydrolytische Spaltung des Rückgrats der Typ II (Arabino-)Galactane in *exo*-Manier gezeigt werden (Tsumuraya *et al.* 1990).

Ein weiteres Multienzympräparat mit kohlenhydratspezifischen Enzymen ist Viscozyme L, welches laut Hersteller unter anderem über Arabinanase-, Xylanase-, Cellulase- und Hemicellulase-Aktivitäten verfügt. Babbar und Mitarbeitende konnten die Aktivität der *endo*-Arabinanase in Viscozyme L bestätigen und zusätzlich zeigen, dass eine enzymatische Hydrolyse über α -L-Arabinofuranosidase eine untergeordnete Rolle spielt. Dies wurde auch von Leijdekkers und Mitarbeitenden vermutet, welche eine Freisetzung höheroligomerer, vermutlich hochverzweigter Arabinanstrukturen durch die Umsetzung von Zuckerrübenpülpe mit Viscozyme L erzielten (Leijdekkers *et al.* 2013). Die größte Aktivität zeigte Viscozyme L in der Studie von Babbar und Mitarbeitenden allerdings gegenüber Polygalacturonsäure (Babbar *et al.* 2017). Diese wird dabei sowohl *endo*- als auch *exo*-hydrolytisch abgebaut, wobei letztere Hydrolyse in der Bildung großer Mengen an monomerer Galacturonsäure resultiert (Combo *et al.* 2012). Durch die Freisetzung von Methanol nach Behandlung von methylierten Pektinen mit Viscozyme L konnte zusätzlich eine Pektinmethylesterase-Aktivität gezeigt werden (Anthon und Barrett 2008). Dies kann die Aktivität von Viscozyme L gegenüber hochmethylierten Pektinen erklären (Evans *et al.* 2002). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Viscozyme L Galactan- und Rhamnogalacturonan-Standardsubstanzen *endo*-hydrolytisch spalten kann (Khodaei und Karboune 2016). Leijdekkers und Mitarbeitende grenzten die Aktivitäten gegenüber dem Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane über die Analyse freigesetzter Oligosaccharide ein. So konnten überwiegend Strukturen mit Galacturonsäureeinheiten sowohl am reduzierenden als auch am nicht-reduzierenden Ende der Oligosaccharide nachgewiesen werden. Daraus schlossen sie neben einer Rhamnogalacturonanhydrolase- auch auf eine Rhamnogalacturonan Rhamnohydrolase-Aktivität. So können einerseits α -(1 \rightarrow 2)-glykosidische Bindungen zwischen Galacturonsäure und Rhamnose unter der Freisetzung von Oligosacchariden mit Galacturonsäure am reduzierenden Ende gespalten werden. Andererseits werden Rhamnoseeinheiten *exo*-hydrolytisch vom nicht-reduzierenden Ende abgespalten. Das Vorhandensein einer Rhamnogalacturonan Galacturonohydrolase-Aktivität konnte dahingegen ausgeschlossen werden (Leijdekkers *et al.* 2013).

Im Rahmen der Masterarbeit von Hannah Dräger (geb. Gaul) wurde die zeitabhängige enzymatische Freisetzung von Oligosacchariden aus den in Kapitel 3.1. beschriebenen kommerziellen Pektinen untersucht. Dafür wurden diese mit den Multienzympräparaten Driselase bzw. Viscozyme L zwischen 0 und 16 h inkubiert, was in Kapitel 8.3. detailliert beschrieben ist (Gaul 2020). Die resultierenden Oligosaccharide wurden mittels HPAEC-PAD/MS-basierter Analyse charakterisiert (vgl. Kapitel 8.5.1.).

3.4.2. *In vitro* Fermentation mit humaner Fäzes

Ein weiterführender Ansatz zur Simulation der intestinalen Fermentation von Pektinen ist die *in vitro* Fermentation mit humanen Fäzesproben, welche durch die darin enthaltenen Kolonbakterien und deren Enzyme ermöglicht wird (vgl. Kapitel 1.4.1.). Dabei ist allerdings zu beachten, dass in den humanen Fäzes nur ein Bruchteil der im Kolon vertretenen Bakterien enthalten ist und so eine Repräsentation der gesamten Mikrobiota nicht möglich ist (Zoetendal *et al.* 2002). Zusätzlich ist bei Humanfäzes eine hohe Variabilität zwischen individuellen Proben zu erwarten, da die Zusammensetzung der Bakterien im Darm und so auch in den Fäzes unter anderem durch die Ernährung, eventuelle Krankheiten sowie den Lebensstil beeinflusst werden. Dennoch eignen sich *in vitro* Fermentationsansätze als vereinfachte Modelle für erste Rückschlüsse auf die im Verlauf der Verdauung ablaufende Fermentationskinetik der Pektinstruktureinheiten. Die im Folgenden beschriebenen *in vitro* Fermentationsversuche wurden nach dem in Abbildung 6 dargestellten Schema unter der Leitung von Dr. Melanie Huch im Arbeitsbereich Darmökologie am Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse des Max Rubner-Instituts durchgeführt.

Bei der Auswahl der Probandinnen und Probanden für die Probennahme zur Herstellung des Inokulums wurde aufgrund einer Vielzahl an Einflussfaktoren auf einige Kriterien geachtet. So wurde unter anderem berücksichtigt, dass keine chronischen Krankheiten vorlagen, die Probandinnen und Probanden in den vorangegangenen 3 Monaten keine Antibiotika zu sich genommen hatten und keine Schwangerschaft vorlag. Alle Freiwilligen haben sich entsprechend einer nicht spezifizierten westlichen Ernährungsweise ernährt. Um individuelle Faktoren dennoch zu minimieren, wurden für die *in vitro* Fermentationsansätze Mischfäzessuspensionen verwendet. Dafür wurden von insgesamt vier Probandinnen und Probanden Fäzesproben genommen und unter strikt anaeroben Bedingungen bei 37 °C aufgearbeitet (Huch *et al.* 2022). Die Fäzesproben wurden dabei zunächst separat in Fermentationsmedium suspendiert und grobe Partikel abgetrennt (Holck *et al.* 2011). Durch das Poolen der humanen Fäzessuspensionen wurde schließlich die Mischfäzes hergestellt. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden die *in vitro* Fermentationen in mehreren Ansätzen mit unterschiedlichen Fäzesproben durchgeführt. Die Nahme der Fäzesproben für die Fermentationsversuche der verschiedenen biologischen Replikate erfolgte in wöchentlichen Intervallen mit den jeweils gleichen Probandinnen und Probanden. So war es möglich, für jedes der eingesetzten Pektine die Proben von jeweils drei biologischen Replikaten getrennt voneinander zu analysieren. Die *in vitro* Fermentationen wurden schließlich mit humanen Mischfäzessuspensionen und einer Endkonzentration an Pektinen von 5,0 g/L bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich zur Fermentation aller in den Kapiteln 3.1. und 3.2. beschriebenen Pektine wurden verschiedene Kontrollansätze mitgeführt. So erfolgte die Inkubation des reinen Fermentationsmediums sowie des Fermentationsmediums zusammen mit humaner Fäzessuspension ohne

3. Material und Methoden

zugegebene Pektinlösung. Des Weiteren wurde eine gemeinsame Inkubation von Fermentationsmedium und Pektinlösung durchgeführt (Blindprobe), um einen möglichen Abbau der Pektine ohne zugesetzte Fäzessuspension auszuschließen. Die Probennahme erfolgte bei allen *in vitro* Fermentations- und Kontroll- bzw. Blindversuchen nach 10 min, 4 h, 24 h und 48 h aus den jeweiligen Ansätzen. Nach der Entnahme wurden die Proben umgehend eingefroren und bis zur Aufarbeitung (vgl. Kapitel 3.5.) bei -80 °C gelagert. Es ist zu beachten, dass die *in vitro* Fermentationsversuche der labortechnisch extrahierten Pektine mit abweichenden Probandinnen und Probanden und zu einem anderen Zeitpunkt als die der kommerziellen Pektine durchgeführt wurden. Um die Ergebnisse zwischen den Fermentationsversuchen einordnen zu können, wurde CP2 als Vergleichsprobe im Ansatz der labortechnischen Pektine mitgeführt.

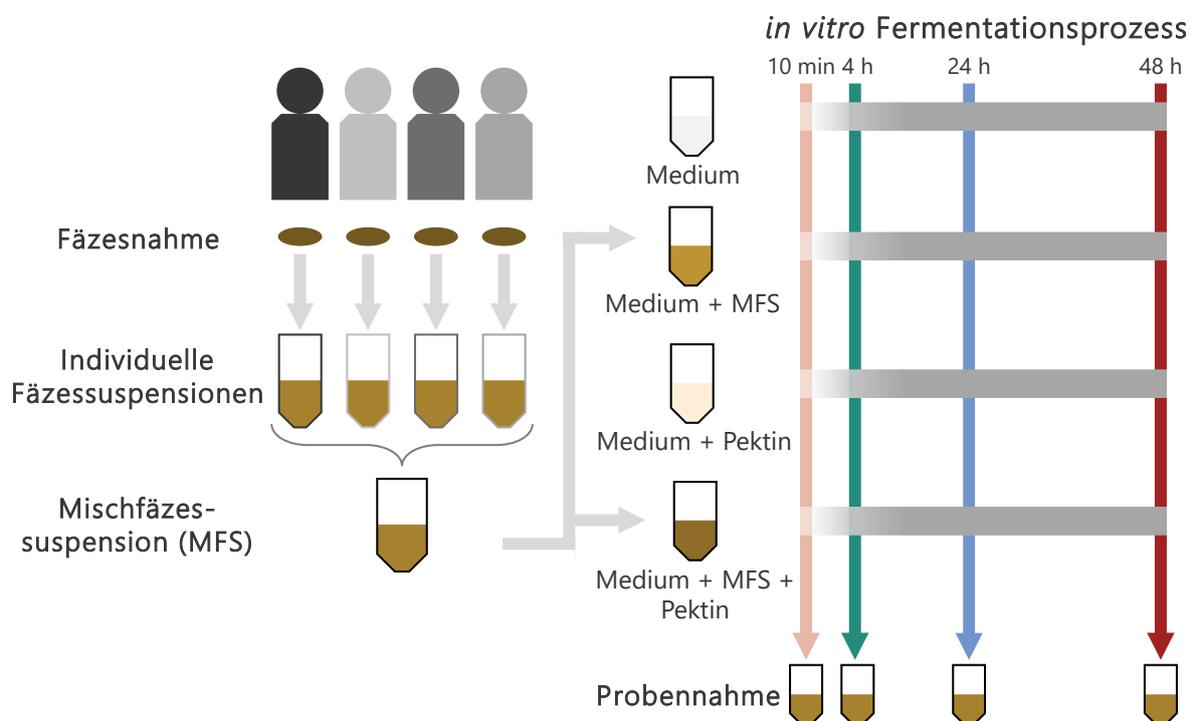


Abbildung 6: Schematische Darstellung der *in vitro* Fermentationsstudie der verschiedenen Pektine. Für den Fermentationsprozess wurden alle in Kapitel 3.1. und Kapitel 3.2. beschriebenen kommerziellen und labortechnisch extrahierten Pektine eingesetzt. Als Kontrollproben wurden das Fermentationsmedium, Medium und Mischfäzessuspension (MFS, zusammengesetzt aus den Fäzesproben von 4 Probandinnen und Probanden) mitgeführt. Als Blindprobe diente ein Ansatz mit Medium und Pektin ohne MFS. Die Probennahme erfolgte jeweils nach 10 min, 4 h, 24 h und 48 h Fermentationszeit

3.4.3. Murine *in vivo* Fermentationsstudie

Als weitere Möglichkeit zur Analyse der Pektinfermentation eignen sich tierbasierte *in vivo* Modelle, da hierbei nicht nur die bakterielle Fermentation im Rahmen einer externen Inkubation durchgeführt wird, sondern die gesamten biochemischen Prozesse berücksichtigt werden. In der biomedizinischen Wissenschaft haben sich dabei insbesondere murine Modelle etabliert, da die Anatomie, Physiologie und Genetik der Mäuse sowie einige grundlegende Mechanismen teilweise starke Ähnlichkeiten zum Menschen aufweisen. Durch den partiell vergleichbaren Aufbau des

Verdauungstraktes von Maus und Mensch wurden diese Modelle auch zunehmend für die Untersuchung der intestinalen Fermentation verwendet (Nguyen *et al.* 2015). Dennoch gibt es zwischen den beiden Spezies einige Unterschiede in der intestinalen Anatomie. Zwar zeigte sich das Verhältnis der gesamten intestinalen Oberfläche zur Körperoberfläche zwischen Mäusen und Menschen als nahezu gleich. Bei der Betrachtung des Verhältnisses einzelner intestinaler Abschnitte zueinander wurden allerdings große Unterschiede ausgemacht. So konnte gezeigt werden, dass unter anderem das Oberflächenverhältnis von Dünndarm zu Dickdarm bei Mäusen nur einem Bruchteil von dem des Menschen entspricht (Casteleyn *et al.* 2010). Außerdem ist der Blinddarm von Mäusen vergleichsweise groß, wodurch es ihnen ermöglicht wird, verhältnismäßig mehr Nährstoffe aus unverdaulichen Nahrungsbestandteilen zu resorbieren (Treuting und Dintzis 2012; Nguyen *et al.* 2015). So weisen Mäuse vermutlich eine höhere Fähigkeit zur Fermentation von Ballaststoffen auf als Menschen, bei welchen die Fermentation überwiegend auf den Dickdarm beschränkt ist und nur zu geringen Anteilen im distalen Dünndarm stattfindet (Hugenholz und Vos 2018). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Mikrobiota zwischen Maus und Mensch insbesondere hinsichtlich der Häufigkeit einzelner Bakteriengattungen und Bakterienspezies stark variieren kann (Treuting und Dintzis 2012; Hugenholz und Vos 2018). Eine Möglichkeit zur Anpassung des Mikrobioms stellt die Verwendung gnotobiotischer Mäuse dar, welche durch ihre keimfreie Aufzucht kein funktionierendes Mikrobiom entwickeln. Durch die Kolonisierung humaner Mikroorganismen wird die Ausbildung eines gezielten Mikrobioms realisiert. Dadurch können intestinale Prozesse in besserer Übereinstimmung zum Menschen untersucht werden. Allerdings ist auch hier zu beachten, dass sich humane Mikroorganismen im Intestinaltrakt von Mäusen teilweise anders verhalten als im Menschen. So wurde unter anderem gezeigt, dass humane im Gegensatz zu murinen Bakterien der Spezies *Lactobacillus reuteri* im Magen von gnotobiotischen Mäusen keine Biofilme ausbilden konnten (Frese *et al.* 2013). Dennoch eignen sich Mausmodelle für Fermentationsstudien, um beispielsweise erste Rückschlüsse auf Auswirkungen unterschiedlicher Ernährung auf einzelne Prozesse oder den Gesamtorganismus zu bekommen. Dabei können durch die Einhaltung einer strengen Diät und Haltungswiese der Tiere gut kontrollierte Bedingungen hergestellt werden und externe Einflüsse auf die Mikrobiota minimiert werden. Die im folgenden beschriebenen Experimente in murinen Modellen wurden von Dr. Frank Blanco-Perez am Paul-Ehrlich-Institut in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Hintergrund der Studien war dabei die Evaluierung möglicher positiver Effekte auf Nahrungsmittelallergien durch die Aufnahme von Pektinen. Dies wird in dieser Arbeit jedoch nicht weiter spezifiziert.

Als Versuchstiere für die murinen Modelle wurden 6 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse des Stamms CBA/J eingesetzt, welche unter speziellen pathogenfreien Bedingungen und unter Gewährleistung von Wasser- und Nahrungszufuhr aufgezogen wurden. Die Mäuse wurden randomisiert unterschiedlichen Gruppen mit variierender Fütterung (vgl. Abbildung 7) zugeteilt.

3. Material und Methoden

Die Zusammensetzung der Futterpellets und die Monosaccharidverteilung der in den Pellets enthaltenen Kohlenhydrate sind in Tabelle B 1 und Tabelle B 2 im Anhang dargestellt. Zunächst haben alle Tiere über 2 Wochen ein standardisiertes Kontrollfutter mit einem Anteil von 20 % Cellulose in den Futterpellets und ohne zugesetzte Pektine erhalten, um möglichst vergleichbare Ausgangsbedingungen zu generieren. Bei einer Gruppe wurde die Fütterung mit Kontrollfutter über den folgenden Zeitraum fortgeführt. Die Zusammensetzung der Futterpellets der anderen Gruppen wurde dahingegen so angepasst, dass deren Pektinanteil 5 bzw. 15 % betrug. Bei den dafür eingesetzten Pektinen handelte es sich um CP2 und AP2 sowie AP-L und CP-L1, wobei letztere lediglich mit einem Anteil von 15 % im Futter verfüttert wurden. Im Verlauf der regulierten Fütterung wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Fäzesproben gesammelt, wobei jeweils die Proben zweier Mäuse eines Käfigs gepoolt wurden. Die erste Probennahme erfolgte dabei innerhalb der ersten 2 Wochen, um Kontrollproben ohne Pektingabe für alle Fütterungsgruppen zur Verfügung zu haben. Zudem erfolgten weitere Probennahmen an 2 bzw. 3 Tagen im Zeitraum der Pektinfütterung bzw. der weiteren Kontrolldiät. Die Fäzesproben wurden umgehend eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung und der Analyse von nicht fermentierten Oligo- und Polysaccharidstrukturen gelagert (vgl. Kapitel 3.5. und Kapitel 3.6.).

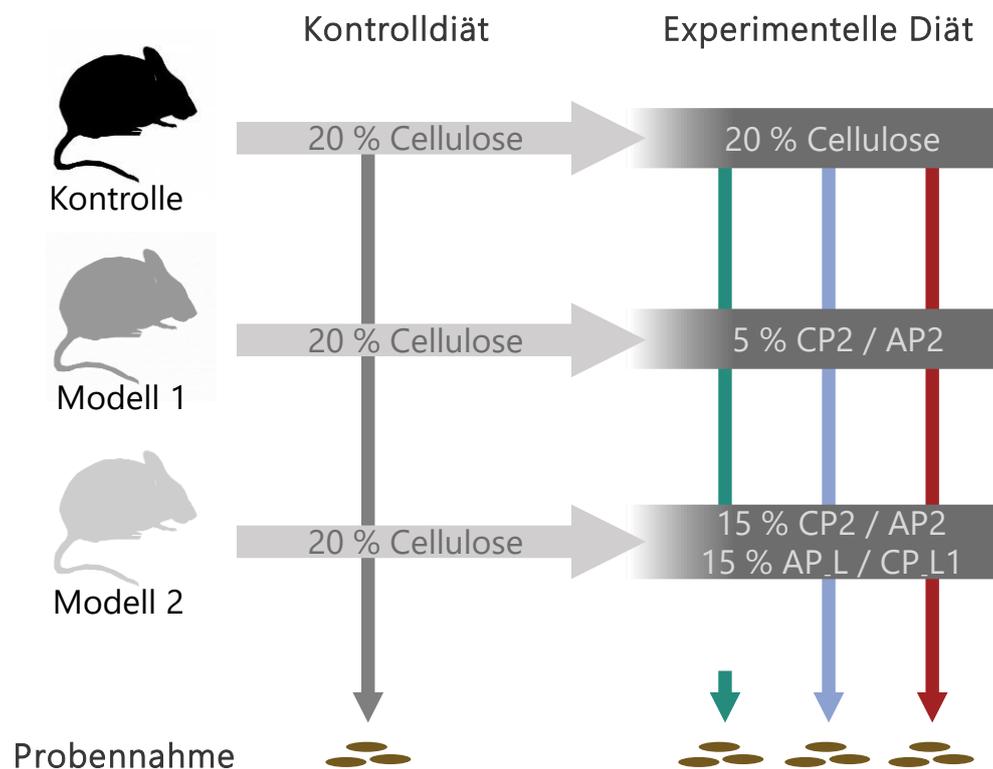


Abbildung 7: Schematische Darstellung der unterschiedlichen murinen Fütterungsmodelle. Die Kontrollgruppe wurde über den gesamten Zeitraum mit einem Celluloseanteil von 20 % im Futter gefüttert. Die Gruppe von Modell 1 hat einen Pektinanteil von 5 % im Futter, die Gruppe von Modell 2 einen Pektinanteil von 15 %. Die Entnahme der Fäzesproben erfolgte für alle Proben an einem Zeitpunkt während der 14-tägigen Kontrolldiät und an 2 (für AP-L und CP-L1) bis 3 (für CP2 und AP2) Zeitpunkten während der experimentellen Diät. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP-L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP-L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin

3.4.4. Humane *in vivo* Fermentationsstudie

Durch *in vitro* und tierbasierte *in vivo* Studien lassen sich die komplexen biochemischen Prozesse im Menschen nur begrenzt nachstellen. Daher sind Humanstudien für detaillierte Erkenntnisse über die Pektinfermentation und mögliche nicht fermentierte Pektinstrukturen am besten geeignet. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Probandinnen und Probanden, anders als die Tiere im murinen Modell, keine gleichen und kontrollierten Lebensarten aufweisen. So kann sich durch variierende Lebensstile, eine individuelle Ernährung und weitere extrinsische Faktoren eine stark unterschiedliche Mikrobiota zwischen den Probandinnen und Probanden ausbilden, was wiederum in Unterschieden in der Fermentation der Pektine resultieren kann. Bei geeignetem Studiendesign mit ausreichend diversen Probandinnen und Probanden ist allerdings der Überblick über eine Vielfalt an Individuen mit variierendem Mikrobiom möglich. Grundlegend für die in Rahmen dieses Projekts durchgeführte Humanstudie war jedoch nicht die Pektinfermentation als solche, sondern das Verfolgen eines potentiell positiven Effekts einer regelmäßigen Pektinaufnahme auf Nahrungsmittelallergien. Als momentan am besten geeignetes Studiendesign für dementsprechende Fragestellungen hat sich die doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie in der Wissenschaft etabliert. Dabei werden die Patientinnen und Patienten randomisiert unterschiedlichen Gruppen zugewiesen, welche sich in Kontroll- und Interventionsgruppe unterteilen. Durch die zufällige Aufteilung sollen offenkundige und unterbewusste Selektionsmechanismen bei der Zuweisung der Gruppen ausgeschlossen werden. Die Doppelverblindung der Studie wird realisiert, indem weder Ärztinnen und Ärzte noch Patientinnen und Patienten wissen, welcher Gruppe die jeweiligen Teilnehmenden angehören. So kann zusätzlich eine bewusste sowie unbewusste Beeinflussung der Ergebnisse sowohl aus Sicht der Ärztinnen und Ärzte als auch aus Sicht der Patientinnen und Patienten ausgeschlossen werden. Durch die strikte Einhaltung der Doppelverblindung bis zum Ende des Studienzeitraums kann die Authentizität der Ergebnisse gewährleistet werden. Nach Ablauf der Interventionsdauer und der jeweils letzten Probennahme kann schließlich die Studie entblindet und so mögliche interventionsbedingte Effekte eruiert werden. Die im folgenden beschriebene Humanstudie wurde entsprechend eines doppelblinden Placebo-kontrollierten Studiendesigns durch das *Instituto de Investigación Biomédica de Málaga* (IBIMA) in Malaga (Spanien) durchgeführt und vom Paul-Ehrlich-Institut koordiniert. Die diätetische Interventionsstudie wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik in Malaga genehmigt und verfolgte das Ziel, den Effekt einer definierten Aufnahme von Pektinen auf eine vorliegende Pfirsichallergie der Probandinnen und Probanden zu untersuchen. Die klinischen Ergebnisse werden in der folgenden Arbeit nicht weiter konkretisiert.

Bei den Probandinnen und Probanden dieser Humanstudie handelt es sich um Personen im Alter zwischen 20 und 50 Jahren mit einer eindeutig nachgewiesenen Pfirsichallergie. Diese wurden randomisiert in eine aktive Gruppe und eine Placebogruppe unterteilt. Die Mitglieder jeder

3. Material und Methoden

Gruppe erhielten über einen Zeitraum von 60 Tagen zweimal täglich eine Mahlzeit entsprechend ihrer jeweiligen Gruppe. Um eine unterbewusste Beeinflussung der Probandinnen und Probanden auszuschließen, musste bei der Auswahl der Mahlzeiten auf einen vergleichbaren Geschmack und ein vergleichbares Aussehen geachtet werden. Daher wurden als Basis 5 g Maltodextrin in 100 mL Wasser gelöst, was gleichzeitig der Placebo-Nahrung entsprach. Für die aktive Gruppe wurden zusätzlich zu Maltodextrin 10 g des Pektins AP2 gelöst, sodass die Probandinnen und Probanden geregelt täglich 20 g Pektin zu sich nahmen. Für die Untersuchung möglicher nicht fermentierter Pektinstruktureinheiten (vgl. Kapitel 3.6.) wurden Fäzesproben der Patientinnen und Patienten gesammelt und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) suspendiert. Dabei haben insgesamt 15 Probandinnen und Probanden über die gesamte Laufzeit an der Studie teilgenommen und sowohl vor Beginn (Tag 0) als auch nach Abschluss der Studie (Tag 60) Stuhlproben abgegeben. Diese wurden im direkten Anschluss an die Probennahme eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung (vgl. Kapitel 3.5.) gelagert.

3.5. AUFARBEITUNG DER PROBEN NACH FERMENTATION

Die Proben nach den unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Fermentationsstudien setzen sich aus vielen verschiedenen Komponenten zusammen. Für die weiteren Analysen dieser Arbeit sind jedoch ausschließlich die Kohlenhydratkomponenten von Relevanz. Um dabei eine getrennte Analyse der möglichen in den Proben enthaltenen Oligo- und Polysaccharide zu realisieren, müssen diese zunächst voneinander separiert werden. Dafür werden verschiedene Methoden beschrieben, welche allesamt auf dem Löslichkeitsverhalten der unterschiedlichen Strukturen basieren. So können beispielsweise neutrale Salze wie Natrium- oder Kaliumchlorid zu den gelösten Kohlenhydraten gegeben werden. Mit steigender Salzkonzentration kommt es zu einer zunehmenden Konkurrenz zwischen dem Salz und den Polysacchariden um die solvatisierenden Wassermoleküle. Ab einer gewissen Salzkonzentration stehen schließlich unzureichend Wassermoleküle zur Verfügung, um die Polysaccharide in Lösung zu halten, was in deren Präzipitation resultiert. Die Effizienz dieser Separationsmethode wird durch viele Faktoren beeinflusst. So begünstigen niedrige Polysaccharidkonzentrationen in der Lösung deren Präzipitation. Außerdem können sowohl der pH-Wert der Lösung als auch die Temperatur einen Einfluss auf das Ausfallen der Polysaccharide haben. Ein Nachteil der Methode sind hohe Salzlasten in den separierten Oligo- und Polysaccharidfraktionen, welche die im Anschluss erfolgenden Analysen beeinträchtigen können und eine aufwändige Aufreinigung beispielsweise mittels Dialyse oder Ionenaustauscher benötigen.

Für negativ geladene Polysaccharide eignet sich eine Präzipitationsmethode mit quartären Ammoniumsalzen. Diese können sich an die Polysaccharide anlagern und Komplexe ausbilden, welche in Lösungen mit geringer Ionenstärke nicht weiter löslich sind und ausfallen. Hierdurch ist

3.5. Aufarbeitung der Proben nach Fermentation

zusätzlich eine Trennung von neutralen und geladenen Polysacchariden möglich. Allerdings ist auch bei dieser Methode eine Dialyse zur Entfernung der Salzfracht notwendig (Shi 2016).

Als weiteres geeignetes Verfahren hat sich die Präzipitation der Polysaccharide mit organischen Lösungsmitteln erwiesen, wie sie auch teilweise in der Industrie für die Gewinnung von Pektinen eingesetzt wird (vgl. Kapitel 1.2.). Diese basiert darauf, dass Polysaccharide mit zunehmenden Anteilen an organischen Lösungsmitteln und der daraus resultierenden geringeren Polarität des Lösungsmittels nicht mehr solubilisiert werden können und ausfallen. Je nach Anteil an beispielsweise Ethanol kann so eine Präzipitation der polymeren Kohlenhydrate erzielt werden, während Oligosaccharide weitgehend oder vollständig in Lösung verbleiben. Die dafür benötigte Konzentration an Ethanol ist strukturabhängig, sodass beispielsweise lineare Polysaccharide ein anderes Löslichkeitsverhalten in ethanolischen Lösungen aufweisen als verzweigte und somit komplexere Pektine (Xu *et al.* 2014). Zusätzlich beeinflussen pektingebundene, insbesondere bivalente Kationen die Präzipitation, da diese in einer geringeren Solvatisierung der Pektine durch Wassermoleküle resultieren. Liegen beispielsweise die Galacturonsäureeinheiten der Homogalacturonane bei hohen pH-Werten dissoziiert und ohne gebundene Kationen vor, kommt es zu einer stärkeren Interaktion der Pektine mit den vorliegenden Wassermolekülen, was eine geringere Effizienz der Präzipitation bedingt. Durch den gezielten Zusatz von Kationen können auch oligomere Pektinstruktureinheiten in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol präzipitiert werden. Allerdings ist durch die damit bedingte Präzipitation von sowohl Oligo- als auch Polysacchariden keine gezielte Separierung der beiden Fraktionen mehr möglich (Guo *et al.* 2017). So ist die Präzipitation von Pektinen ein Prozess, der multifaktoriell beeinflusst wird.

Die Auftrennung von Oligo- und Polysacchariden in den Proben nach den verschiedenen Fermentationsversuchen wurde in dieser Arbeit anhand ihrer Löslichkeit in ethanolischer Lösung ohne Zugabe von Kationen realisiert. Dafür wurde eine Endkonzentration von 80 % Ethanol (v/v) gewählt, welche in der Literatur weit verbreitet für die Präzipitation von Polysacchariden ist (Xu *et al.* 2014). Bei den enzymatischen und *in vitro* Fermentationsansätzen (vgl. Kapitel 3.4.1. und 3.4.2.) wurde dies über die Zugabe des entsprechenden Volumens an Ethanol zu den Fermentations-suspensionen umgesetzt. Die Fäzesproben aus den murinen Modellen und der Humanstudie (vgl. Kapitel 3.4.3. und Kapitel 3.4.4.) wurden dahingegen direkt in 80 % Ethanol (v/v) suspendiert, um eine mögliche Aktivität von bakteriellen Enzymen im wässrigen Milieu und so einen weiteren Abbau der Kohlenhydratstruktureinheiten zu unterbinden. Da eine Trocknung bzw. Bestimmung des Wassergehalts der Fäzesproben nicht möglich war, wurde ein Überschuss an ethanolischer Lösung zugegeben, sodass die Beeinflussung der Ethanolkonzentration durch das Restwasser in den Fäzes vernachlässigbar war. Gleichzeitig sollte dadurch die Extraktion möglicher Oligosaccharide aus den Fäzes in die ethanolische Phase realisiert werden. Die ethanolunlöslichen Polysaccharidfraktionen wurden anschließend mehrfach mit 80 % Ethanol (v/v) und reinem Ethanol gewaschen, um potentiell eingeschlossene ethanollösliche Verbindungen zu entfernen.

3. Material und Methoden

So wurden für die jeweiligen Fermentationsansätze eine feste Fraktion mit möglichen nicht fermentierten Polysacchariden und eine ethanolische Fraktion mit möglichen freigesetzten Oligosacchariden erhalten. Die detaillierte Vorgehensweise ist in Kapitel 8.4. dargestellt.

Die ethanolunlöslichen Fraktionen wurden anschließend allesamt hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung nach saurer Hydrolyse analysiert (vgl. Kapitel 3.3.1.). Für die entsprechenden Fraktionen der enzymatischen und *in vitro* Fermentationsversuche wurden zusätzlich die Molekulargewichtsverteilungen betrachtet (vgl. Kapitel 3.3.4.). Um eine Analyse der möglichen Oligosaccharide zu realisieren, wurde das ethanolische Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand in analysenentsprechenden Lösungsmitteln (Wasser für HPAEC, vgl. Kapitel 8.5.1.; ACN/Wasser (50/50, v/v) für Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC), vgl. Kapitel 8.5.2.) aufgenommen. Für die Proben der Humanstudie wurde eine zusätzliche Aufarbeitung benötigt, um die Salze der PBS zu entfernen. Dies wurde unter Verwendung von *Porous Graphitized Carbon* (PGC-) Kartuschen ermöglicht, welche neutrale und saure Oligosaccharide retardieren. Unter der Verwendung von Wasser werden Salze und Monosaccharide eluiert, während die Elution der (sauren) Oligosaccharide mittels ACN/Wasser (50/50, v/v) mit 0,1 % Ameisensäure erfolgte (vgl. Kapitel 8.4.3.). Die weiterführende Charakterisierung der Oligosaccharide ist in Kapitel 3.6. beschrieben.

3.6. CHARAKTERISIERUNG FREIGESETZTER OLIGOSACCHARIDE

3.6.1. NMR-spektroskopische Verfahren

Für die Strukturaufklärung von Oligosacchariden aus Pektinen eignen sich unter anderem NMR-spektroskopische Experimente als nicht-destruktive Analyseverfahren. Deren Prinzip basiert auf der Tatsache, dass spezielle Atomkerne aufgrund eines Kernspins ein magnetisches Dipolmoment besitzen. Dieses kann mehrere Orientierungen annehmen, welche ohne äußeres Magnetfeld energetisch gleich, also entartet, vorliegen. Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, richten sich die Drehimpulse aus und durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung kann sich der Energiezustand der Kerne verändern. Die makroskopische Magnetisierung, welche sich aus der Summe der z-Komponenten aller magnetischen Kernmomente einer Probe ergibt, wird aus der z-Achse in die x'-y'-Ebene ausgelenkt. Das dabei induzierte oszillierende Signal in der Detektorspule, das proportional zur Quermagnetisierung entlang y' ist, nimmt durch Relaxationsprozesse ab. Aus dem erhaltenen *Free Induction Decay* (FID) wird das NMR-Spektrum durch Fourier-Transformation erhalten (Zerbe und Jurt 2013).

Für die Messung der Analyten können diese in unterschiedlichen Lösungsmitteln wie Deuteriumoxid oder DMSO- d_6 solvatisiert und beispielsweise bei Raumtemperatur vermessen werden. Die Signale weisen spezifische Verschiebungen und Kopplungskonstanten auf und können so zur Strukturcharakterisierung der Analyten eingesetzt werden. So weisen beispiels-

3.6. Charakterisierung freigesetzter Oligosaccharide

weise die Signale der anomeren Protonen in ^1H -NMR Spektren meist eine deutliche chemische Verschiebung (δ) ins Tieffeld auf ($\delta = \text{ca. } 4,40 - 5,40 \text{ ppm}$). Über die Kopplungskonstante der dabei entstehenden Dublettsignale kann in den meisten Fällen die anomere Konfiguration (α oder β) nicht-reduzierender Monosaccharideinheiten bestimmt werden. Im Bereich der restlichen Protonen kommt es allerdings häufig zu Signalüberlappungen, welche beim Vorliegen von Matrixkomponenten oder Verunreinigungen auch im Bereich der anomeren Protonen auftreten können (Hatzakis 2019). Aufgrund dieser Limitierungen wird häufig auf 2D-NMR spektroskopische Experimente für die Analyse von Oligosacchariden zurückgegriffen. Dabei können gleichartige (homonukleare Experimente) oder verschiedenartige Kerne (heteronukleare Experimente) über ihre Kopplungen miteinander korreliert werden. So erwies sich unter anderem die HSQC-NMR Spektroskopie als geeignetes Experiment für die Strukturaufklärung von Oligosacchariden. Durch ^1H - ^{13}C -HSQC Experimente wird die direkte Kopplung benachbarter, kovalent gebundener C- und H-Atome im Molekül sichtbar gemacht. Da hierbei die Spektren um eine zweite Frequenzachse erweitert werden, werden vergleichsweise übersichtliche Spektren mit hohem Informationsgehalt erhalten. Über die Kombination mehrerer 2D-NMR Experimente können weitreichende Rückschlüsse auf die Struktur von freigesetzten Pektinoligosacchariden gezogen werden (Colquhoun *et al.* 1990; Dourado *et al.* 2006; Wefers *et al.* 2014). Da NMR-spektroskopische Methoden allerdings eine vergleichsweise geringe Sensitivität aufweisen, werden teilweise hohe Probenmengen und/oder lange Analysezeiten für eine ausreichende Signalintensität benötigt. Daher wurden NMR-basierte Experimente lediglich für ein ausgewähltes Oligosaccharid durchgeführt (vgl. Kapitel 8.5.4.).

3.6.2. HPLC-MS-basierte Verfahren

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturaufklärung sind MS-basierte Analysen. Um eine sinnvolle MS-Detektion zu ermöglichen, ist meist eine Auftrennung der Analyten notwendig. Für Pektinoligosaccharide eignen sich flüssigkeitschromatographische Verfahren. So wurde beispielsweise PGC als geeignete stationäre HPLC-Phase für die Auftrennung komplexer Arabinan-oligosaccharide beschrieben (Westphal *et al.* 2010a). Auch die Trennung eines breiten Spektrums weiterer neutraler und saurer Oligosaccharide ist auf dieser Phase möglich (Westphal *et al.* 2010c). Der zugrundeliegende Mechanismus der Retention basiert unter anderem auf einem Elektronentransfer zwischen Säulenmaterial und sauren Analyten und daraus resultierenden Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Zusätzlich erfolgt bei neutralen Oligosacchariden eine Trennung nach ihrer Größe. Der detaillierte Mechanismus der Retention konnte bisher allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt werden (West *et al.* 2010). Eine Alternative zur Trennung hochpolarer Analyten stellt die hydrophile Interaktionschromatographie (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) dar. Die stationäre Phase setzt sich zumeist aus Silica-basierten Partikeln zusammen, welche mit polaren funktionellen Gruppen wie Amid- oder Diolgruppen derivatisiert

3. Material und Methoden

wurden. Für die Auftrennung galacturonsäurehaltiger Oligosaccharide aus Pektinen wird dabei meist auf eine Modifizierung des Säulenmaterials mit Amidgruppen zurückgegriffen (Remoroza *et al.* 2012; Leijdekkers *et al.* 2013; Ognyanov *et al.* 2016). Als entscheidender Faktor für die Retention der Analyten wird eine elutionsmittelabhängige Anlagerung einer partiell immobilisierten wasserangereicherten Schicht um die polare stationäre Phase vermutet, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit Oligosacchariden ausbilden kann. Bei ionischen stationären Phasen treten außerdem pH-abhängig negative oder positive Ladungen auf, welche zusätzlich zu den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen über ionische Wechselwirkungen geladene Oligosaccharide retardieren können (Hemström und Irgum 2006). Die Elution der Analyten erfolgt bei der HILIC meist über einen binären Gradienten mit wässrigem und organischem Bestandteil. Unter dem Einfluss geringer Anteile an wässrigen Eluenten (< 50 %) werden polare Interaktionen zwischen mobiler und stationärer Phase weitgehend unterdrückt und Analyten werden durch hydrophile Interaktionen mit der stationären Phase retardiert. Mit höheren Anteilen an Wasser im Eluenten (> 50 %) werden die hydrophilen Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase stärker, was schließlich in der Elution der Analyten resultiert. Dabei ist zu beachten, dass mögliche in der mobilen Phase enthaltene Ionen Wechselwirkungen mit geladenen Gruppen der Analyten sowie der stationären Phase eingehen, wodurch die ionischen Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial und Analyten verringert werden (Wuhrer *et al.* 2009). Als weitere Methode zur Auftrennung von neutralen und geladenen Pektinligosacchariden eignet sich die HPAEC, deren Prinzip bereits in Kapitel 3.3.1. erläutert wurde. Ein Vorteil der PGC- und HILIC-basierten Trennung der Oligosaccharide liegt darin, dass die Elution nicht unter stark alkalischen Bedingungen stattfindet und so Informationen über mögliche Methyl- und Acetylveresterungen erhalten werden.

Für die MS-Detektion flüssigkeitschromatographischer Analysen eignet sich als Ionisationstechnik insbesondere die Elektrospray-Ionisation (ESI), da eine direkte Überführung von Ionen aus der flüssigen in die Gasphase möglich ist. Dafür werden die gelösten Analyten durch eine Metallkapillare geleitet, welche durch das Anlegen einer Spannung geladen ist, und Ionen aus dem Eluenten werden eliminiert. Durch diese Ladungstrennung im Eluenten kommt es zur Bildung eines Taylor-Konus an der Spitze der Kapillare und die Analyten treten in Form eines Aerosols aus der Kapillare aus. Durch den Einsatz eines Gases (meist Stickstoff) kann einerseits die Vernebelung des Analyten unterstützt werden und andererseits die Verdampfung des Lösungsmittels (Desolvatationsgas) ermöglicht werden. Durch die damit erzeugte Verringerung des Tröpfchenradius vergrößert sich die Dichte elektrischer Ladungen auf der Oberfläche der Tröpfchen. Zur endgültigen Freisetzung der Ionen in die Gasphase gibt es verschiedene Theorien. Dabei beschreibt die Coulomb-Explosion eine Abstoßung der in den Tröpfchen enthaltenen, gleichartig geladenen Teilchen und eine daraus resultierende, explosionsartige Freisetzung der geladenen Analyten in die Gasphase (El-Aneed *et al.* 2009). Eine weitere Theorie zum Zerfall der

3.6. Charakterisierung freigesetzter Oligosaccharide

geladenen Tröpfchen ist die *Droplet Jet Fission*, bei welcher das Abstoßen einer Vielzahl an Mikrotröpfchen mit einer hohen Ladungsdichte am verjüngten Ende der im Flug befindlichen Tröpfchen vermutet wird (Cole 2000). Insgesamt ist der Mechanismus zur Freisetzung der Analyten in die Gasphase jedoch noch nicht vollständig geklärt. Bei der Ionisation können je nach angelegter Spannung (Polarität) unterschiedlich geladene Ionen gebildet werden. Da es sich bei der ESI um eine sanfte Ionisierungsmethode handelt, werden überwiegend Quasimolekülonen erzeugt. Zusätzlich können insbesondere bei höhermolekularen Substanzen mehrfach geladene Ionen entstehen. Das Ausmaß der Fragmentierung ist für gewöhnlich gering.

Über eine Transferkapillare gelangen die gebildeten Ionen schließlich in das Hochvakuum des Massenanalysators. Dort werden die Analytionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) aufgetrennt. Als ein einfacher und weit verbreiteter massenselektiver Detektor hat sich der Single-Quadrupol-Massenanalysator etabliert. Dessen Grundaufbau ist durch vier parallele Elektroden charakterisiert. Durch das Anlegen einer Gleichspannung und einer überlagerten Wechselspannung ergibt sich ein wechselndes Gesamtpotential, durch welches die oszillierende Flugbahn von Ionen mit definiertem m/z stabilisiert werden kann. Die so separierten Ionen können schließlich über Detektoren wie Sekundärelektronenvervielfacher detektiert werden. Durch das Scannen eines zuvor festgelegten m/z -Bereichs wird ein *Total Ion Chromatogram* (TIC) erhalten. Zusätzlich kann ein *Single Ion Monitoring* (SIM) durchgeführt werden, bei welchem lediglich Ionen mit ausgewähltem m/z den Quadrupol passieren können und so empfindlich erfasst werden. Bei der Kopplung von ESI mit Quadrupol-Massenanalysatoren gibt es die Möglichkeit der zusätzlichen Fragmentierung der Analytionen über eine kollisionsinduzierte Dissoziation (*Collision-Induced Dissoziation*, CID). Dafür wird vor dem Übergang der Analytionen ins Hochvakuum im Bereich der Transferkapillare eine Spannung angelegt. Die Ionen werden durch das elektrische Feld zusätzlich beschleunigt und kollidieren mit den neutralen Molekülen des Trägergases. Dies bewirkt unter anderem eine Auflösung von Clustern aus Analyten und Lösungsmittelmolekülen, wodurch eine Verringerung des Rauschens erzielt wird. Ist die CID-Spannung ausreichend hoch, wird ein Teil der Energie in Form von innerer Energie absorbiert, was in der Fragmentierung der Molekülonen resultiert. Typisch für Oligosaccharide ist dabei unter anderem die Spaltung der glykosidischen Bindungen.

In dieser Arbeit wurde die Charakterisierung der freigesetzten Pektinoligosaccharide nach *in vitro* und *in vivo* Fermentation über eine im Arbeitskreis etablierte Kombination aus HPAEC-PAD mit paralleler MS-Detektion durchgeführt. Durch die für die chromatographische Trennung benötigten hohen pH-Werte (vgl. Kapitel 3.3.1.) und die damit einhergehende hohe Salzlast im Eluenten ist eine direkte MS-Analyse nach Auftrennung der Analyten allerdings nicht möglich. Um dennoch eine parallele PAD- und MS-Detektion zu realisieren, wird der Eluent nach Verlassen der Trennsäule in zwei Teile gesplittet, wovon der eine direkt zum PAD geleitet wird. Der andere Teil wird für die MS-Detektion über einen elektrolytisch regenerierenden Suppressor entsalzt. Dafür

3. Material und Methoden

wird Wasser an der Anode elektrolytisch in H_3O^+ Ionen und an der Kathode in OH^- Ionen unter der Bildung von O_2 und H_2 aufgespalten. Über eine ionensensitive Membran gelangen die Na^+ Ionen des Eluenten in die Kathodenkammer, wo sie zusammen mit den OH^- Ionen des Regeneranten in den Abfall geleitet werden. Die H_3O^+ Ionen der Anodenkammer gelangen wiederum über die ionensensitive Membran zum Eluenten, wo die mit den OH^- Ionen zu Wasser umgesetzt werden. Der entsalzte Eluent wird als Schutz für das MS anschließend durch einen Leitfähigkeitsdetektor (*Conductivity Detector*, CD) hinsichtlich der Entsalzung überprüft. Für die Bildung stabiler Lithiumaddukte aus den Analyten werden schließlich geringe Mengen einer Lithiumchloridlösung zum Eluenten geleitet. Die Ionisierung erfolgt über eine ESI im positiven Modus, die massenselektive Detektion mit einem einfachen Quadrupol. Zusätzlich wurde über das Anlegen einer CID-Spannung von 100 eV eine Fragmentierung der Analyten induziert. Die chromatographischen und MS-Bedingungen sind in Kapitel 8.5.1. aufgeführt.

Für eine weiterführende Charakterisierung der Oligosaccharidstrukturen eignen sich hochauflösende und mehrdimensionale MS-Experimente ((HR)MSⁿ). Bei der neusten kommerziell bedeutsamen Entwicklung im Bereich der Hochauflösung handelt es sich um das Orbitrap-MS (schematische Darstellung s. Abbildung 8). Da hierbei die Ionenzufuhr diskontinuierlich sein muss, wird bei Nutzung der ESI als kontinuierliche Ionisationsquelle beispielsweise eine C-Falle der Orbitrap vorgeschaltet. Die darin verbauten Elektroden speichern über die Erzeugung eines elektrischen Feldes die Ionen und ermöglichen anschließend deren schnelle, diskontinuierliche Injektion. Die Orbitrap selbst ist aus einer spindelförmigen Zentralelektrode und einer über Isolierung geteilte Außenelektrode aufgebaut, welche entlang einer horizontalen Achse ausgerichtet sind. An den Elektroden kann unabhängig voneinander eine Spannung angelegt werden. Das dabei erzeugte elektrische Feld sorgt für eine Oszillation der Ionen um die Zentralelektrode und entlang der z-Achse, wobei die Frequenz der axialen Schwingung abhängig von m/z ist. Über die Schwingung der Ionen wird wiederum ein elektrisches Feld (*Ion Image Current*) erzeugt, welches von den äußeren Elektroden erfasst und als Massenspektrum ausgegeben werden kann. Durch eine *Higher-Energy Collisional Dissoziation* (HCD) ist eine zusätzliche Fragmentierung der Ionen möglich. Dabei gelangen die Molekülionen über die C-Falle zunächst in eine Kollisionszelle, wo sie wiederum über die Kollision mit neutralen Gasmolekülen fragmentiert werden. Diese werden anschließend in die Orbitrap geleitet und auf die beschriebene Weise detektiert. Durch die hohe mögliche HCD-Spannung von < 1000 eV erfolgt eine deutlich stärkere Fragmentierung der Molekülionen als bei der beschriebenen CID (100 eV), wodurch ein Mehrgewinn an Informationen möglich ist.

3.6. Charakterisierung freigesetzter Oligosaccharide

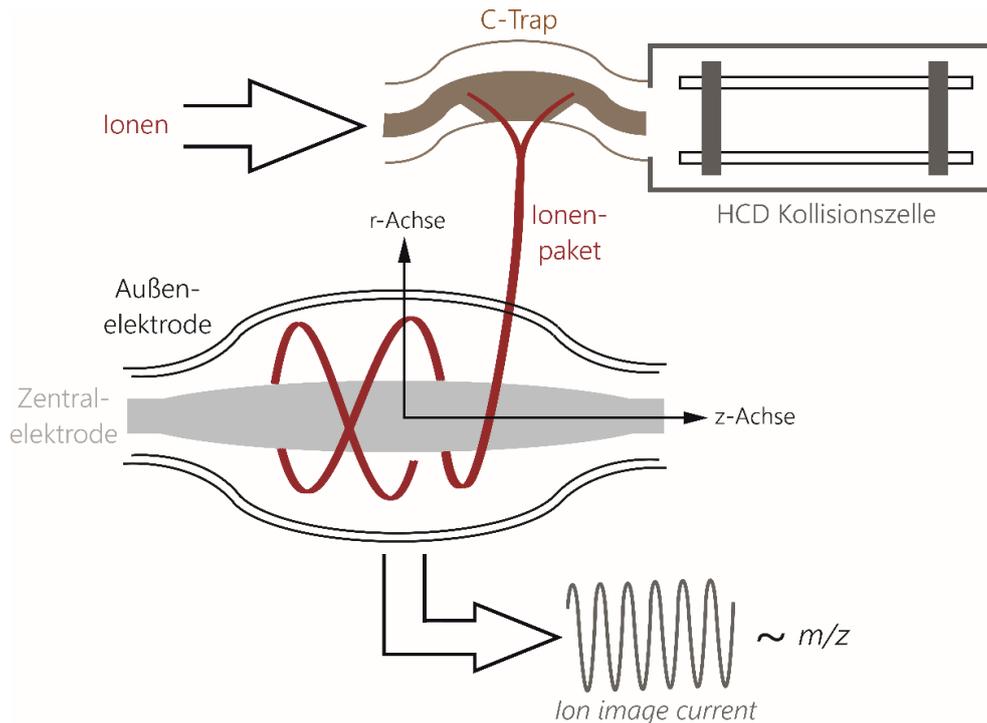


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise einer Orbitrap nach Ionisation, Fokussierung und Quadrupol-Isolierung. Die Ionen werden in der C-Trap normalisiert und gekühlt und gelangen als Ionenpakete in den Orbitrap-Massenanalysator. Dort oszillieren sie mit spezifischem Radius um die und entlang der z-Achse, was ein elektrisches Feld (*Ion Image Current*) auf die äußere Elektrode induziert. Dieses ist proportional zu m/z und kann über Fourier-Transformation als Massenspektrum ausgegeben werden kann

In dieser Arbeit wurden die freigesetzten uronsäurehaltigen Pektinoligosaccharide über eine HILIC-Säule aufgetrennt und mittels MS^2 -Experiment an einer Orbitrap detektiert. Die zugrundeliegenden Bedingungen sind in Kapitel 8.5.2. aufgeführt.

3.6.3. Isolierung freigesetzter Oligosaccharide

Um die Strukturcharakterisierung einzelner Oligosaccharide nach den Fermentationsversuchen zu ermöglichen, eignet sich deren präparative Isolierung. Die Trennung der Analyten kann dabei über verschiedene flüssigkeitschromatographische Verfahren bzw. stationäre Phasen erfolgen. Die Isolierung erfolgt idealerweise an (semi)präparativen Säulen, welche allerdings in ihrer Verfügbarkeit limitiert und mit einem großen Kostenaufwand verbunden sind. Für die semi-präparative Isolierung von Maltooligosacchariden sowie von Arabinan- und (Arabino-)Galactan-oligosacchariden hat sich beispielsweise eine semipräparative C18-Säule als geeignet erwiesen (Hicks und Sondey 1987; Wefers und Bunzel 2016a). Durch den Einsatz (semi)präparativer Säulen ist es je nach Anwendung möglich, die Oligosaccharide in ausreichender Konzentration innerhalb eines Laufes zu isolieren. Da in dieser Arbeit jedoch nur geringe Mengen an Probenmaterial zur Verfügung standen, wurde der Einsatz einer analytischen Säule für die Isolierung der freigesetzten Pektinoligosaccharide gewählt. Die geringe Kapazität analytischer Säulen erfordert dabei jedoch eine mehrmalige Injektion und Sammlung der Analyten, um eine ausreichende Menge an isoliertem Probenmaterial zu erhalten. Um dies mit angemessenem Zeitaufwand zu realisieren,

3. Material und Methoden

können beispielsweise programmierbare Fraktionssammler eingesetzt werden. Als geeignete Methode zur empfindlichen Auftrennung und Detektion von Mono- und Oligosacchariden eignet sich wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben eine HPAEC-PAD-basierte Analyse. Dennoch wird das chromatographische Verfahren nur selten zur präparativen Isolierung eingesetzt (An *et al.* 1994; Huisman *et al.* 2001). Grund dafür ist unter anderem die in Kapitel 3.3.1. und 3.6.2. beschriebene hohe Salzlaster der Eluenten, welche für die benötigten alkalischen Bedingungen unerlässlich ist. Um mögliche Interferenzen in den weiterführenden Analysen zu verhindern, ist eine Entsalzung der Proben notwendig. Diese kann einerseits über externe Aufreinigung mittels Ionenaustauscherharze oder PGC-Kartuschen erfolgen (vgl. Kapitel 3.5.). Andererseits ist die Entsalzung wiederum innerhalb des chromatographischen Systems durch den Einsatz eines elektrolytisch regenerierenden Suppressors möglich (vgl. Kapitel 3.6.2.).

In dieser Arbeit wurde sich für die Isolierung der freigesetzten Oligosaccharide an einer analytischen HPAEC-Säule entschieden. Dafür wurde der Eluentenfluss nach der Säule gesplittet und ein Teil über den PAD geleitet. Der restliche Teil wurde über einen Suppressor entsalzt und gelangte über einen CD zum programmierbaren Fraktionssammler. Die Bedingungen zur Isolierung der Oligosaccharide sind in Kapitel 8.5.3. beschrieben. Ein Teil der isolierten Oligosaccharide wurde aufkonzentriert und mittels HPAEC-PAD/MS hinsichtlich ihrer m/z analysiert (vgl. Kapitel 3.6.2.). Der größere Teil der Analyten wurde eingedampft und zur Analyse der Monosaccharidzusammensetzung verwendet (vgl. Kapitel 3.3.1.).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. OPTIMIERUNG DER PARAMETER ZUR PEKTINEXTRAKTION

Anhand der in Kapitel 3.2.2. beschriebenen Faktoren wurde die Extraktion der Pektine aus Apfeltrester und Citrusschalen (Partikeldurchmesser < 2 mm) hinsichtlich Ausbeute und struktureller Charakteristika der Pektine optimiert. So sollten Pektine mit möglichst gering modifizierter Struktur bei gleichzeitig hoher Ausbeute erhalten werden. Erste Rückschlüsse auf die Struktur wurden anhand der Monosaccharidzusammensetzungen der Polysaccharide nach Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse getroffen (vgl. Kapitel 3.3.1.). Über die Anteile von Arabinose und Galactose war es möglich, Informationen über den Gehalt an neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane im Vergleich zum Gesamtpektin zu erhalten. Da insbesondere die glykosidischen Bindungen zwischen den α -furanosidischen Monomereinheiten der Arabinane labil gegenüber saurer Hydrolyse sind, konnte der Anteil an Arabinose als Parameter für das Ausmaß der Modifikation der Pektine und damit für die Auswahl der Extraktionsparameter herangezogen werden. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Extraktionen aus Apfeltrester und Citrusschalen sind in Tabelle B 3, Tabelle B 4, Tabelle B 6 und Tabelle B 7 im Anhang mit den entsprechenden Ausbeuten zusammengefasst.

4.1.1. Grundparameter der Pektinextraktion

Zur Beeinflussung der Pektinextraktion wurden zunächst unterschiedliche Extraktionsmittel bei sonst gleichbleibenden Extraktionsbedingungen (90 min bei 95 °C) eingesetzt. Die erhaltenen Pektine wurden hinsichtlich ihrer Ausbeute (bezogen auf die Trockenmasse des eingesetzten Ausgangsmaterials) und ihrer Struktur verglichen.

Um möglichst milde Bedingungen während der Pektinextraktion zu realisieren, wurde zunächst vollentsalztes Wasser als Extraktionsmittel eingesetzt. Dabei hat sich bei einem Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis von 1:25 bei Citrusschalen ein pH-Wert von etwa 4,2 eingestellt, während für Apfeltrester der entsprechende pH-Wert mit ca. 3,7 etwas niedriger lag. Durch die beschriebene Extraktion konnte für das resultierende Citruspektin eine Ausbeute von etwa 10,4 % erzielt werden, während sich die Ausbeute bei Einsatz des Apfeltresters auf ca. 9,1 % belief.

Aufgrund ihrer Eigenschaft als Komplexbildner wurden weitere Extraktionen unter Einsatz von 4,5 mM Citronensäure durchgeführt. Dadurch wurde der initiale pH-Wert der Extraktion bei beiden Rohstoffen verringert, was in einem pH-Wert von 3,4 für Citrusschalen und 3,1 für Apfeltrester resultierte. Für beide Ausgangsmaterialien konnte durch den Einsatz von Citronensäurelösung eine Ausbeutesteigerung auf 16,9 % für Citruspektin bzw. auf 12,9 % für Apfelpektin erzielt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Als weiterer für die Pektinextraktion geeigneter Komplexbildner wurde Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beschrieben (Yeoh *et al.* 2008). Unter Verwendung von 50 mM EDTA-Lösung konnte für Citruspektin eine Steigerung der Ausbeute auf 21,1 % erreicht werden. Im Gegensatz dazu war für Apfelpektin mit 12,5 % im Vergleich zur Verwendung von Citronensäurelösung keine Veränderung zu beobachten.

Um zu beurteilen, ob die unterschiedlichen Extraktionsmittel einen Einfluss auf die resultierende Pektinstruktur haben, wurde von allen gewonnenen Pektinen die Monosaccharidzusammensetzung nach saurer Hydrolyse überprüft. Aus den Daten der Citruspektine (vgl. Abbildung 9) geht hervor, dass insbesondere die Pektine nach wässriger und citronensäurebasierter Extraktion durch hohe Anteile an Arabinose (etwa 40 mol%) und Galactose (etwa 22 mol%) gekennzeichnet sind. Dagegen ist der Anteil an Galacturonsäure mit ca. 20 mol% vergleichsweise gering. Insgesamt unterscheidet sich die Verteilung der Monosaccharide zwischen den beiden Extraktionsmitteln bei den erhaltenen Citruspektinen unter den eingesetzten Bedingungen kaum.

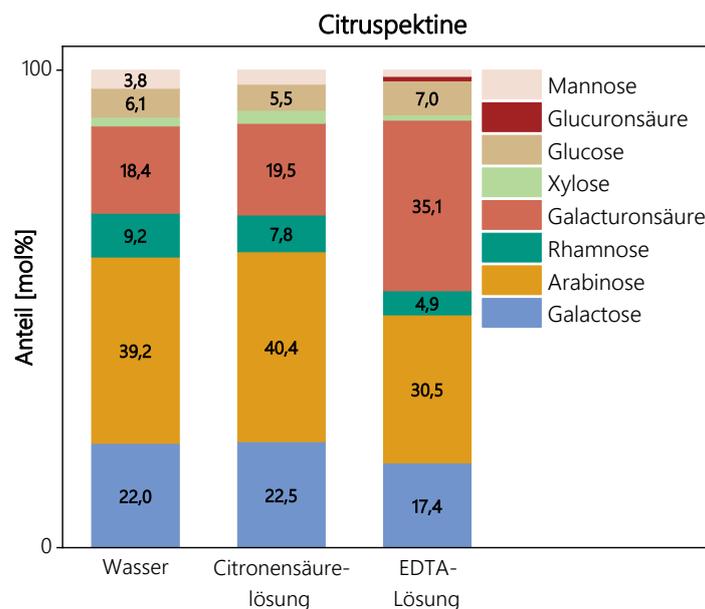


Abbildung 9: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n = 3) der unter Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmittel (vollentsalztes Wasser, 4,5 mM Citronensäurelösung und 50 mM Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Lösung) aus Citruschalen gewonnenen Pektine. Die Extraktionen der Pektine erfolgten über 90 min bei 95 °C. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %

Im Vergleich dazu ergab die Extraktion mit EDTA-Lösung Pektine mit geringeren Anteilen an Arabinose (30 mol%) und Galactose (17 mol%), während der Galacturonsäureanteil mit rund 35 mol% höher liegt. Eine Erklärung für die abweichenden Monosaccharidzusammensetzungen sind die komplexbildenden Eigenschaften und die im Vergleich zur Citronensäureextraktion höhere Konzentration der eingesetzten EDTA-Lösung. So ist für den Einsatz von Komplexbildnern bei der Pektinextraktion bekannt, dass sie mit den dissoziierten Säuregruppen der Galacturonsäureeinheiten um bivalente Kationen konkurrieren, was in einer verbesserten Löslichkeit der

4.1. Optimierung der Parameter zur Pektinextraktion

Pektine resultiert. Da diese Komplexierung vornehmlich die Galacturonsäureeinheiten der Pektine betrifft, wird durch den Einsatz von EDTA-Lösung insbesondere die Extraktion von Homogalacturonanstruktureinheiten verbessert. Aufgrund des damit einhergehenden geringeren Anteils an neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane im Pektin wurde von einer EDTA-unterstützten Extraktion abgesehen.

In den unterschiedlich extrahierten Apfelpektinen wurde ein konstanter Galactoseanteil von etwa 17 mol% beobachtet (vgl. Abbildung 10). Der Anteil an Arabinose war dahingegen bei Verwendung von Wasser als Extraktionsmittel mit rund 37 mol% am höchsten. Sowohl bei der Extraktion mit Citronensäurelösung als auch mit EDTA-Lösung sind die Arabinoseanteile mit ca. 26 mol% und 17 mol% geringer. Gleichzeitig nimmt der Glucoseanteil bei beiden Extraktionsprotokollen auf 18 mol% bzw. 29 mol% zu. Dies geht vermutlich auf co-extrahierte nicht-Pektinstrukturen wie Stärke zurück. Der Galacturonsäureanteil ist extraktionsübergreifend zwischen 22 und 27 mol% in einem ähnlichen Bereich.

Da bei der labortechnischen Extraktion neben einem hohen Anteil an neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane auch möglichst reine Pektine erhalten werden sollten, wurde bei der Pektinextraktion aus Apfeltrester lediglich Wasser als Extraktionsmittel gewählt.

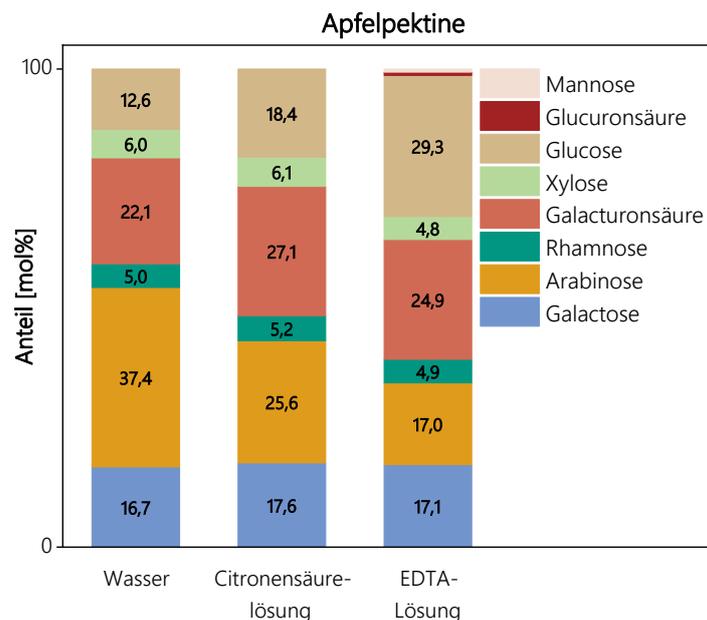


Abbildung 10: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n=3) der unter Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmittel (vollentsalztes Wasser, 4,5 mM Citronensäurelösung und 50 mM Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Lösung) aus Apfeltrester gewonnenen Pektine. Die Extraktionen der Pektine erfolgten über 90 min bei 95 °C. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %

Durch die Prolongierung der Extraktionszeit von 90 min auf 240 min zeigte sich für beide Rohstoffe ein deutlicher Anstieg der Ausbeute. Bei Verwendung von Wasser als Extraktionsmittel wurde für Citruspektine eine Ausbeute von 18,9 % erzielt, während der Ertrag bei Apfelpektinen auf 16,2 % anstieg. Bei einem Einsatz von Citronensäurelösung und einer Extraktionszeit von

4. Ergebnisse und Diskussion

240 min konnte die Ausbeute der Citruspektine ebenfalls deutlich auf ca. 26,3 % gesteigert werden.

Aus den Daten der Monosaccharidzusammensetzungen der länger extrahierten Pektine war pektinübergreifend eine Abnahme des Arabinoseanteils in den Polysacchariden auf 29 - 31 mol% zu beobachten (vgl. Abbildung 11). Dies ist vermutlich wiederum auf den Abbau des labilen α -furanosidisch verknüpften Arabinans oder eine stärker ausgeprägte Extraktion anderer Polysaccharide zurückzuführen. Zusätzlich kann eine Abnahme des Galactosegehalts gegenüber den Extraktionen mit einer Extraktionszeit von 90 min festgestellt werden (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10). Damit einhergehend sind bei allen drei Pektinen höhere Anteile an Galacturonsäure und geringere Anteile an nicht-Pektinstruktureinheiten nachzuweisen. Da für diese Arbeit mit 1 kg Probenmaterial große Mengen an Pektinen benötigt wurden, wurden die Extraktionsansätze unter prolongierter Extraktionszeit dennoch weiterverfolgt.

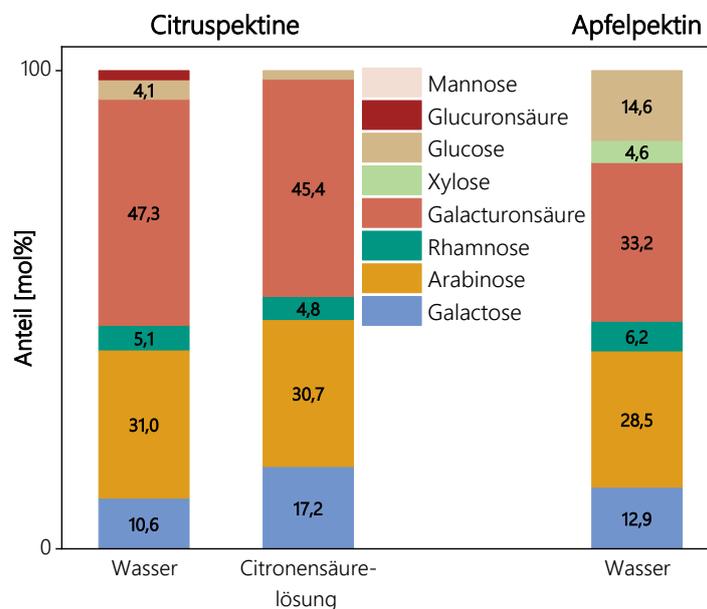


Abbildung 11: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n=3) der unter Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmittel (vollentsalztes Wasser, 4,5 mM Citronensäurelösung) aus Citruschalen und Apfeltrester gewonnenen Pektine. Die Extraktionen der Pektine erfolgten über 240 min bei 95 °C. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungs-anionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %

Als weiterer Faktor zur Beeinflussung der Pektinausbeute und -struktur wurde die Extraktion der Citruspektine mit 4,5 mM Citronensäurelösung bei verschiedenen pH-Werten über 240 min durchgeführt. Neben dem vorherrschenden pH-Wert von 3,4 wurde das Extraktionsgemisch nach vorheriger Äquilibration (60 min) mit Salpetersäure bzw. NaOH auf pH 1,0, 2,0, 4,5 sowie 5,2 eingestellt. Bei einem pH-Wert von 1,0 wurde lediglich eine Ausbeute von 5,5 % erzielt. Dies ist vermutlich auf die fortschreitende säurehydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindungen zurückzuführen, wodurch die Kohlenhydrate bei zunehmend verringertem Molekulargewicht unter den beschriebenen Bedingungen nicht mehr präzipitierbar sind. Bei pH 2,0 konnte mit etwa

4.1. Optimierung der Parameter zur Pektinextraktion

33,5 % die höchste Pektinausbeute erzielt werden. Die Ausbeuten der Pektine nach Extraktion bei pH 4,5 sowie bei pH 5,2 lagen mit rund 16,5 % etwas niedriger als beim initialen pH-Wert von 3,5. Bei Betrachtung der Monosaccharidzusammensetzungen (vgl. Abbildung 12) ist zu sehen, dass der Anteil an Arabinose mit sinkendem pH-Wert des Extraktionslösungsmittels, wie zu erwarten, stark abnimmt. So wurden bei pH 2,0 und pH 1,0 Arabinoseanteile von unter 4 mol% bestimmt. Anders als bei pH 2,0 war bei der Extraktion bei pH 1,0 zusätzlich der Galactoseanteil deutlich reduziert. Das resultierende Pektin besteht mit etwa 93 mol% somit weitgehend aus Galacturonsäure. Bei den Extraktionen bei pH 4,5 und 5,2 waren die Pektine wiederum durch einen höheren Anteil an Arabinose, einhergehend mit einem geringeren Galactoseanteil, geprägt.

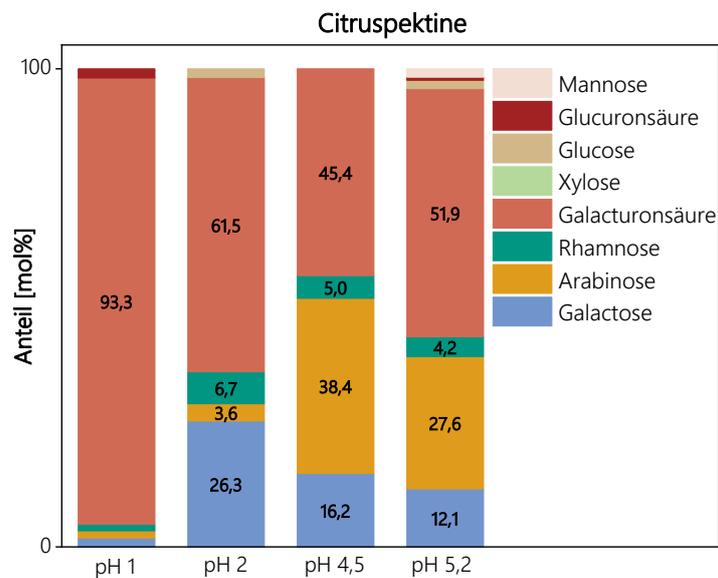


Abbildung 12: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n=3) der bei verschiedenen pH-Werten aus Citruschalen gewonnenen Pektine. Die Extraktionen der Pektine erfolgten unter Verwendung von 4,5 mM Citronensäurelösung über 240 min bei 95 °C. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %

Letztlich wurde sich nach Bewertung der gesammelten Informationen für drei unterschiedliche Extraktionsprotokolle entschieden. Für die Gewinnung eines arabinan- und (arabino-)galactanreichen Citruspektins wurde eine Extraktion mit 4,5 mM Citronensäurelösung über 90 min bei 95 °C ohne pH-Wert Anpassung gewählt (Extraktionsprotokoll 1). Aufgrund des vergleichsweise hohen Anteils an Galactose und der hohen Ausbeute wurde sich zusätzlich für die Extraktion eines (arabino-)galactanreichen Citruspektins mit 4,5 mM Citronensäurelösung bei pH 2,0 (eingestellt mit Salpetersäure) über 240 min bei 95 °C entschieden (Extraktionsprotokoll 2). Eine wässrige Extraktion (pH ~ 3,5) über 240 min bei 95 °C wurde gewählt, um ein arabinan- und (arabino-)galactanreiches Apfelpektin mit erhöhter Ausbeute zu erhalten (Extraktionsprotokoll 3). Alle Extraktionsprotokolle sind detailliert in Kapitel 8.1. beschrieben.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1.2. Enzymatische Unterstützung der Pektinextraktion

Wie in Kapitel 1.2. beschrieben, können enzymatisch unterstützte Extraktionsansätze die Ausbeute an Pektinen steigern. In dieser Arbeit wurde hierfür zunächst das Enzympräparat Celluclast® verwendet, um die Anwendbarkeit von Cellulasen zur Ausbeutensteigerung zu überprüfen. Die enzymatische Inkubation erfolgte dabei jeweils über 60 min bei 40 °C unter Zugabe von 8 U/g Celluclast® und wurde sowohl vor als auch nach der eigentlichen Pektinextraktion, aber ohne vorherige Abtrennung des Ausgangsmaterials durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze zu garantieren, wurde die Enzyminkubation zunächst sowohl bei den Pektinen aus Citruschalen als auch bei den Pektinen aus Apfeltrester mit einem wässrigem Extraktionsverfahren über 240 min kombiniert. Bei vorheriger Enzymbehandlung konnte die Ausbeute an Citruspektinen auf 20,1 % gesteigert werden, während bei einer Nachinkubation der Pektinertrag 22,5 % betrug. Bei den Apfelpektinen wurde durch die enzymatischen Nachbehandlung mit 18,1 % ebenfalls eine höhere Ausbeute erzielt als bei vorheriger Enzyminkubation (16,2 %). Daher wurde sich bei den folgenden Versuchen auf eine enzymatische Inkubation nach der hitzebasierten Extraktion der Pektine beschränkt. Um die Ausbeutensteigerung unter Verwendung verschiedener Enzyme zu betrachten, wurden von der Firma Erbslöh Geisenheim GmbH sieben unterschiedliche Cellulasen zur Verfügung gestellt (im Folgenden Cellulase 1-7, s. Tabelle B 5 im Anhang). Da für die Enzympräparate keine Informationen über spezifische Aktivitäten zur Verfügung standen, wurden pauschal 10 mg Enzym pro 1 g Ausgangsmaterial eingesetzt. Gleichzeitig wurde ein weiterer Ansatz mit Celluclast® sowie ohne Enzymzugabe mitgeführt. Die jeweiligen enzymatisch unterstützten Verfahren wurden für die Citruspektine in Anschluss an Extraktionsprotokoll 1 und für die Apfelpektine in Anschluss an Extraktionsprotokoll 3 durchgeführt.

Die Ausbeuten an Citruspektinen sind in Tabelle B 6 im Anhang dargestellt. Für das ohne Enzymzugabe extrahierte Citruspektin wurde eine Ausbeute von 16,4 % erhalten, welche durch die Inkubation mit Celluclast® auf 20,5 % gesteigert wurde. Auch durch den Einsatz der Cellulasen 1 - 7 konnte die Pektinausbeute im Vergleich zu der Ausgangsprobe ohne Enzymzugabe erhöht werden, wobei die Ausbeuten unter Verwendung von Cellulase 4 und 5 mit 23,9 % und 30,6 % am höchsten waren.

Bei den Monosaccharidzusammensetzungen der erhaltenen Citruspektine (vgl. Abbildung 13) war mit dem Einsatz der Cellulasen 2 und 6 ein Rückgang der jeweiligen Arabinoseanteile zu verzeichnen, was vermutlich auf eine Arabinanase-Nebenaktivität der Enzyme zurückzuführen ist. Bei den enzymunterstützten Extraktionen mit den anderen Cellulasen wurde dahingegen eine Steigerung der Arabinoseanteile beobachtet. Dies ist möglicherweise auf die Freisetzung Cellulose-assoziiertes Pektins durch den Einsatz der Cellulasen zurückzuführen. Andererseits ist ebenfalls, insbesondere bei den Pektinpräparaten mit geringerer Ausbeute, ein Abbau anderer Pektinstrukturen durch Nebenaktivitäten der Enzyme möglich. So ist es möglich, dass der

4.1. Optimierung der Parameter zur Pektinextraktion

verringerte Anteil an Galacturonsäure in diesen Pektinpräparaten aus der Degradierung von Struktureinheiten der Homogalacturonane resultiert. Zusätzlich ist, mit Ausnahme des bei Einsatz von Cellulase 2 erhaltenen Pektins, eine Zunahme der Glucoseanteile zu beobachten. Dies deutet wiederum auf eine vermehrte Co-Extraktion von nicht-Pektinpolysacchariden wie beispielsweise Stärke hin. Da Citruschalen mit etwa 3 - 5 % einen vergleichsweise geringen Stärkegehalt aufweisen, spielt diese allerdings vermutlich eine untergeordnete Rolle (Chau und Huang 2003; O'Shea *et al.* 2015). Alternativ ist denkbar, dass die im Rohstoff enthaltene Cellulose durch die eingesetzten Enzyme so degradiert wird, dass Bruchstücke wasserlöslich sind und nach Präzipitation in den Pektinextrakten vorliegen.

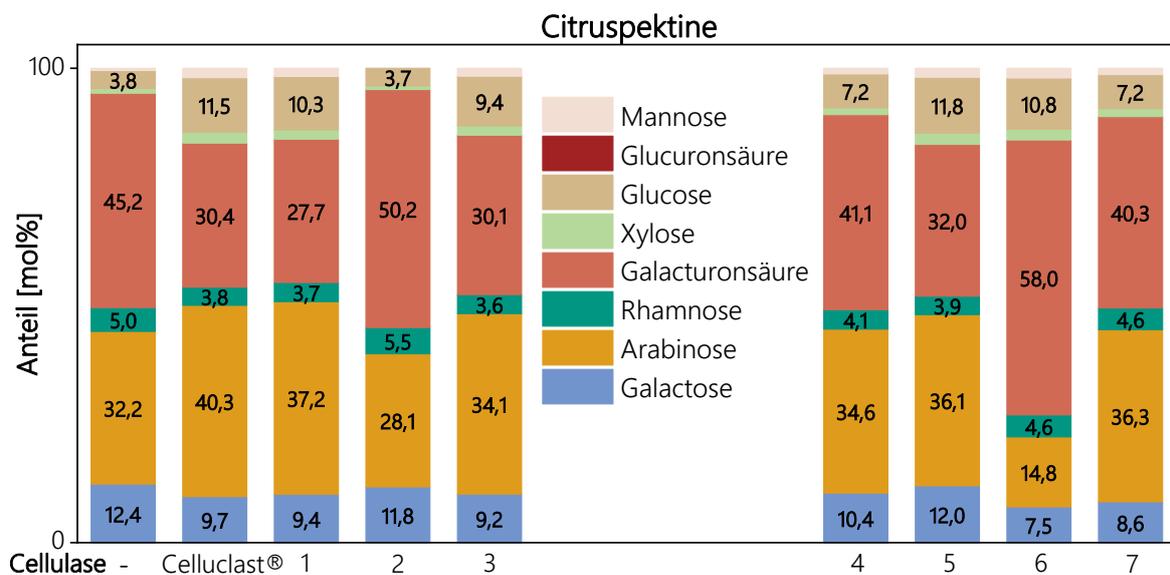


Abbildung 13: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n = 3) der Pektine nach enzymatisch unterstützten Pektinextraktionen aus Citruschalen. Die Extraktionen der Pektine erfolgten unter Verwendung von 4,5 mM Citronensäurelösung (pH = 3,7) über 90 min bei 95 °C. Für die nachfolgende enzymatische Inkubation wurden Celluclast® bzw. Cellulase 1 - 7 der Firma Erbslöh (nähere Spezifikationen in Tabelle B 5 im Anhang) eingesetzt. Der Blindwert wurde ohne Enzymzugabe (-) angesetzt. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure- (TFA-) Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %. Die entsprechenden Ausbeuten sind in Tabelle B 6 im Anhang aufgelistet

Die bei den enzymunterstützten Extraktionen von Pektinen aus Apfeltrester erzielten Ausbeuten sind in Tabelle B 7 im Anhang gezeigt. Dabei wurde die Ausbeute von 16,1 % ohne Enzymzugabe durch den Einsatz von Celluclast® auf 19,9 % gesteigert. Daneben wurde lediglich durch die Cellulasen 4 (17,8 %), 5 (18,4 %) und 7 (16,7 %) eine Ausbeutensteigerung erzielt. Bei Betrachtung der Monosaccharidzusammensetzungen (vgl. Abbildung 14) ist auch hier insbesondere bei Verwendung der Cellulase 6 eine deutliche Verringerung des Arabinoseanteils von etwa 32 mol% ohne Enzymzugabe auf 14 mol% zu beobachten. Dies unterstützt die bereits aufgestellte Hypothese, dass eine Arabinanase-Nebenaktivität vorlag. Bei Einsatz der anderen Cellulasen der Firma Erbslöh wurde ebenfalls ein geringer Rückgang der Arabinoseanteile auf 26 - 29 mol% beobachtet. Gleichzeitig nahmen die Anteile co-extrahierter Glucoseanteile ab.

4. Ergebnisse und Diskussion

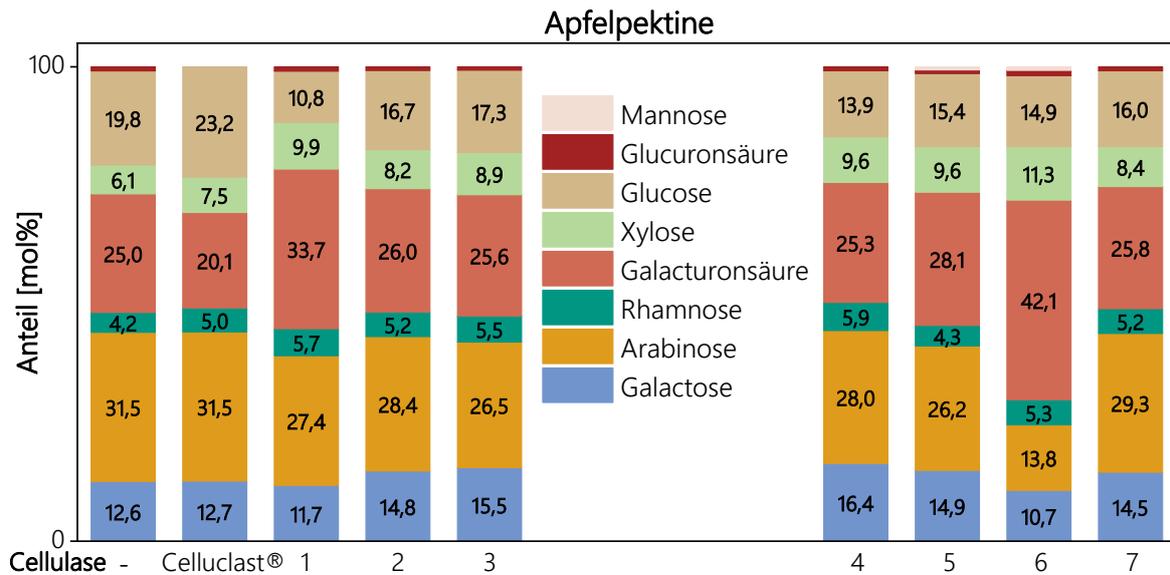


Abbildung 14: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n = 3) der Pektine nach enzymatisch unterstützten Pektinextraktionen aus Apfeltrester. Die Extraktionen der Pektine erfolgten unter Verwendung von vollentsalztem Wasser (pH = 3,7) über 240 min bei 95 °C. Für die nachfolgende enzymatische Inkubation wurden Celluclast® bzw. Cellulase 1-7 der Firma Erbslöh (nähere Spezifikation in Tabelle B 5 im Anhang) eingesetzt. Der Blindwert wurde ohne Enzymzugabe (-) angesetzt. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-) Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %. Die entsprechenden Ausbeuten sind in Tabelle B 7 im Anhang aufgelistet

Anhand der erhaltenen Informationen wurde bei den Extraktionsprotokollen 1 und 3 eine enzymatisch unterstützte Extraktion unter Einsatz von Cellulase 4 der Firma Erbslöh gewählt. Bei Extraktionsprotokoll 2 wurde aufgrund der bereits hohen Pektinausbeute von einer enzymatisch unterstützten Extraktion abgesehen. Die detaillierten Extraktionsprotokolle sind in Kapitel 4.1.1. und Kapitel 8.1. erläutert.

4.1.3. Aufreinigung der Pektine

Wie in Kapitel 4.1.2. beschrieben, ist bei den Pektinen nach Extraktionsprotokoll 1 und 3 jeweils ein hoher Anteil an co-extrahierten glucosehaltigen Kohlenhydraten nachweisbar. Da für die durchgeführten Fermentationsversuche möglichst reine Pektine eingesetzt werden sollten, wurde eine Aufreinigung der Pektine angestrebt. Aufgrund der Vermutung, dass Celluloseoligomere in den Citruspektinen eingeschlossen vorlagen, wurde eine enzymatische Nachbehandlung mit Cellulase 4 durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Pektine in einem separaten Ansatz ohne weitere Enzymzugabe gelöst. Nach erneuter Präzipitation der Polysaccharide wurde wiederum deren Monosaccharidzusammensetzungen untersucht, welche in Abbildung 15 im Vergleich zur Monosaccharidzusammensetzung des Pektins ohne Nachbehandlung dargestellt sind.

In Folge der enzymatischen sowie der nicht-enzymatischen Nachbehandlung waren in den resultierenden Pektinen keine co-extrahierten Kohlenhydrate (beurteilt anhand der Anteile von Glucose, Mannose sowie Xylose) mehr nachweisbar. Dies unterstützt wiederum die Annahme, dass es sich bei den co-extrahierten Bestandteilen um Kohlenhydrate handelt, welche im Zuge

4.1. Optimierung der Parameter zur Pektinextraktion

der Präzipitation in die Pektine eingeschlossen wurden. Durch Lösen ohne Enzymzugabe wurden diese vermutlich bereits freigesetzt und bei der erneuten Präzipitation nicht wieder eingeschlossen. Die Aufreinigung resultierte jedoch auch in einer Abnahme des Arabinoseanteils in den Pektinen. Dies lässt sich vermutlich ebenfalls auf den Einschluss mono- und oligomerer Arabinanstruktureinheiten zurückführen, welche bei der Extraktion unter säurehydrolytischer Spaltung freigesetzt wurden. Um bei den folgenden Extraktionen einen möglichen erneuten Einschluss der Celluloseoligosaccharide zu minimieren, wurde sich für eine enzymatische Aufreinigung der Pektine mit Cellulase 4 entschieden. Um die Aufarbeitung der Pektine möglichst vergleichbar zu gestalten, wurden die Citruspektine nach Extraktionsprotokoll 2 ebenfalls erneut gelöst und präzipitiert. So kann auch in diesem Pektinpräparat der Anteil an co-extrahierten Oligosacchariden minimiert werden.

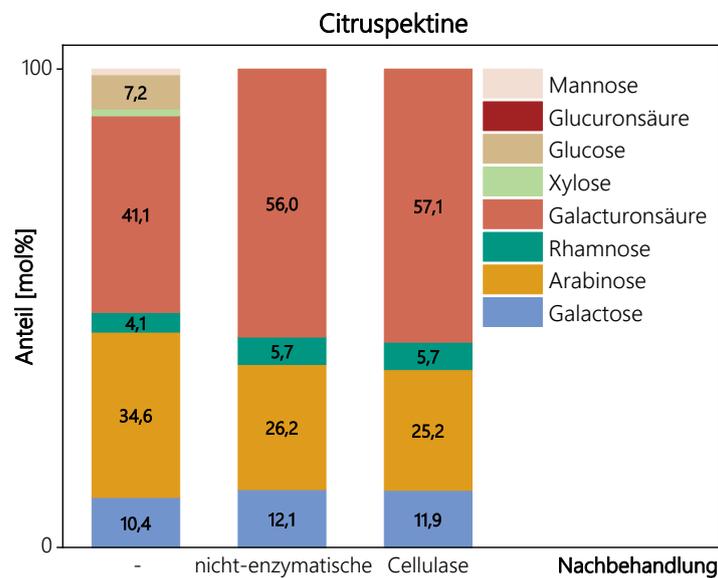


Abbildung 15: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n = 3) der enzymatisch bzw. nicht-enzymatisch nachbehandelten Pektine aus Citrusschalen. Die Extraktion des ursprünglichen Pektins (-) erfolgte unter Verwendung von 4,5 mM Citronensäurelösung (pH = 3,7) über 90 min bei 95 °C mit anschließender enzymatischer Unterstützung (Cellulase 4 der Firma Erbslöh, nähere Spezifikation in Tabelle B 5 im Anhang). Für die Nachbehandlung wurden die Pektine wässrig gelöst und unter Zugabe von Cellulase 4 (enzymatisch) oder ohne Enzymzugabe (nicht-enzymatisch) inkubiert. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-) Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %

Im Vergleich zu Citrusschalen enthält Apfeltrester tendentiell mehr Stärke, weshalb die in den Pektinen enthaltenen glucosehaltigen Kohlenhydrate auch teilweise auf co-extrahierte Stärke zurückzuführen ist (O'Shea *et al.* 2015; Sudha *et al.* 2016). Daher wurde für die enzymatische Aufreinigung des Apfelpektins sowohl α -Amylase als auch Amyloglucosidase eingesetzt, um mögliche α -(1→4)- und α -(1→6)-glykosidische Bindungen zwischen den D-Glucoseeinheiten der Amylose und des Amylopektins zu hydrolysieren. Zusätzlich wurde wiederum ein Ansatz ohne Enzymzugabe mitgeführt. Die Monosaccharidzusammensetzungen der daraus resultierenden Pektine sind in Abbildung 16 dargestellt. Dabei wurde bei der nicht-enzymatischen Aufreinigung der Pektine zwar eine Verringerung des Glucoseanteils erzielt, mit 13 mol% war dieser allerdings

4. Ergebnisse und Diskussion

weiterhin vergleichsweise hoch. Unter Verwendung von α -Amylase und Amyloglucosidase wurde der Glucoseanteil im Pektin dahingegen auf etwa 3 mol% reduziert. Dies unterstützt die These, dass die glucosehaltigen Kohlenhydrate in den Apfelpektinen überwiegend aus Stärkepolysacchariden bestehen und enzymatisch in Abbauprodukte wie Glucose sowie Malto-oligosaccharide degradiert werden. Diese sind ethanollöslich und werden bei der Präzipitation nicht weiter erfasst. Auch bei diesen Ansätzen ist zusätzlich eine Reduktion des Arabinoseanteils zu verzeichnen, was wie bereits beschrieben vermutlich auf eingeschlossene Arabinan-oligosaccharide zurückgeführt werden kann. Da der Glucoseanteil in den Pektinpräparaten durch enzymunterstützte Aufreinigung reduziert wurde, wurde das Extraktionsprotokoll 3 um eine enzymatische Nachbehandlung mit α -Amylase und Amyloglucosidase erweitert.

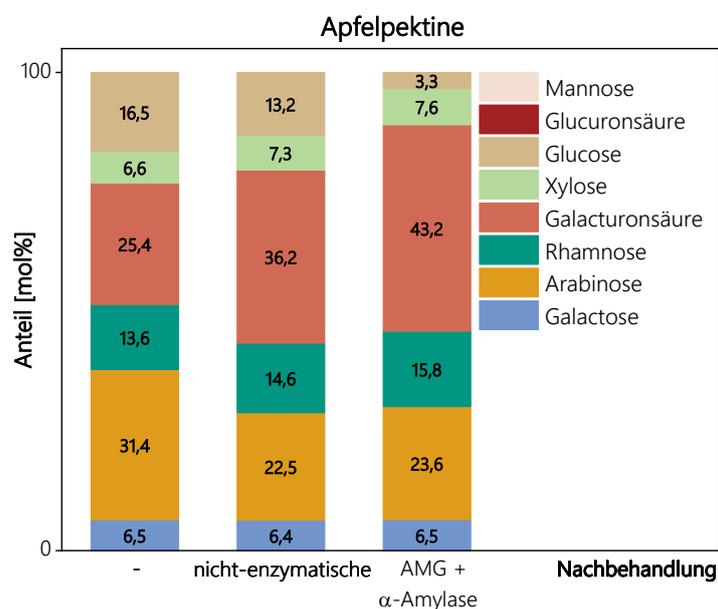


Abbildung 16: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n = 3) der enzymatisch bzw. nicht-enzymatisch nachbehandelten Pektine aus Citruschalen. Die Extraktion des ursprünglichen Pektins (-) erfolgte unter Verwendung von vollentsalztem Wasser (pH = 3,7) über 240 min bei 95 °C mit anschließender enzymatischer Unterstützung (Cellulase 4 der Firma Erbslöh, nähere Spezifikation in Tabelle B 5 im Anhang). Für die Nachbehandlung wurden die Pektine wässrig gelöst und unter Zugabe von Amyloglucosidase (AMG) und α -Amylase (enzymatisch) oder ohne Enzymzugabe (nicht-enzymatisch) inkubiert. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %

Durch Anwendung der hier erarbeiteten Extraktionsprotokolle wurden aus etwa 10 kg Citruschalen 1,1 kg Citruspektin (Extraktionsprotokoll 1 und anschließende Aufreinigung) gewonnen (CP-L1). CP-L2 wurde nach Extraktionsprotokoll 2 aus etwa 5 kg Citruschalen gewonnen, wodurch etwa 1,0 kg aufgereinigtes Pektin erhalten wurde. Bei der Extraktion des Apfelpektins nach Extraktionsprotokoll 3 wurden aus 10 kg Apfeltrester 0,9 kg aufgereinigtes AP-L isoliert.

4.2. STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DER PEKTINE

Die molekularen Strukturen der kommerziellen und labortechnisch extrahierten Pektine wurden detailliert analysiert. Um erste Hinweise auf die Polysaccharidstruktur und die Verhältnisse der einzelnen Pektinstruktureinheiten zu erlangen, wurde die Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide nach Methanolyse und TFA-hydrolytischer Spaltung bestimmt. Zusammen mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse können Rückschlüsse über die Feinstruktur der Pektine wie beispielsweise über den Substitutionsgrad des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane gezogen werden. Über die durch das enzymatische Profiling spezifisch freigesetzten Arabinan- und Typ I (Arabino-)Galactanligosaccharide werden zusätzlich Hinweise auf die Zusammensetzung der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane erhalten. So können Unterschiede in der strukturellen Komplexität zwischen den Pektinen ausgemacht werden. Da sowohl der DM als auch der DAc einen Einfluss auf die Fermentation von Pektinen haben können (vgl. Kapitel 1.4.1.), wurden beide Parameter für alle untersuchten Pektine bestimmt. Zusätzlich wurden das M_w und die nicht-Kohlenhydratbestandteile Asche und Protein betrachtet.

Die Monosaccharidzusammensetzungen der sechs kommerziellen und drei labortechnisch extrahierten Pektine sind in Abbildung 17 dargestellt. Demnach dominierte bei allen untersuchten Pektinen die Galacturonsäure mit einem Anteil von 35,6 - 74,2 mol%. Dieser Anteil wird unter anderem durch Homogalacturonane und substituierte Galacturonane hervorgerufen. Dazu zählen beispielsweise Xylogalacturonane, welche in der Literatur bereits als Bestandteile von Apfelpektinen nachgewiesen wurde (Schols *et al.* 1995a). Auch bei den hier untersuchten Pektinen weisen insbesondere die aus Apfeltrester gewonnenen Pektine AP1, AP2 und AP.L mit 5,1 - 7,9 mol% vergleichsweise hohe Anteile an Xylose auf. Um die Xylose den Xylogalacturonanen zuordnen zu können, wurde für die Apfelpektine eine Methylierungsanalyse mit vorheriger Carboxylreduktion durchgeführt. Dadurch war es möglich, die PMAA der Galacturonsäureeinheiten mitzuerfassen (vgl. Kapitel 3.3.2.). So konnte über den Nachweis des PMAA von 1,3,4-Galactopyranuronsäure gezeigt werden, dass in den Apfelpektinen an Position O-3 substituierte Galacturonsäureeinheiten vorliegen, welche vermutlich überwiegend auf Xylogalacturonane zurückzuführen sind (vgl. Tabelle B 9 im Anhang). Bei Betrachtung der xylosebasierten PMAA überwiegt bei allen drei Apfelpektinen die terminale Xyloseeinheit mit 5,5 - 6,9 mol%. Zusätzlich konnte für die drei Pektine das PMAA der 1,4-substituierten Xylose mit 1,8 - 2,3 mol% nachgewiesen werden. 1,4-Gebundene Xylose kann auf längere Xyloseketten im Xylogalacturonan zurückgeführt werden, wie sie bereits für Apfelpektine nachgewiesen wurden (Zandleven *et al.* 2006), kann aber auch aus co-extrahierten Xylanen stammen.

Neben Homogalacturonanen und substituierten Galacturonanen kann die nachgewiesene Galacturonsäure zusätzlich dem Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane zugewiesen werden, wo sie alternierend mit Rhamnose vertreten ist (vgl. Kapitel 1.1.3.). Durch den vergleichsweise geringen Anteil an Rhamnose von 5,7 - 14,0 mol% bei einem Xyloseanteil von maximal 7,9 mol%

4. Ergebnisse und Diskussion

kann der Galacturonsäureanteil aller Pektine zu einem großen Teil auf Homogalacturonane zurückgeführt werden. Die Pektine SBP und AP-L weisen mit 45,7 mol% bzw. 35,6 mol% die geringsten Anteile an Galacturonsäure auf. Zusammen mit den Rhamnoseanteilen (14,0 mol% für SBP und 8,6 mol% für AP.L) und dem Xyloseanteil (7,9 mol% für AP.L) kann den beiden Pektinen der geringste Anteil an Homogalacturonanen der hier untersuchten Pektine zugeordnet werden. Gleichzeitig weist SBP mit dem höchsten Rhamnoseanteil vermutlich den größten Anteil an Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane bezogen auf die Gesamtstruktur des Pektins auf.

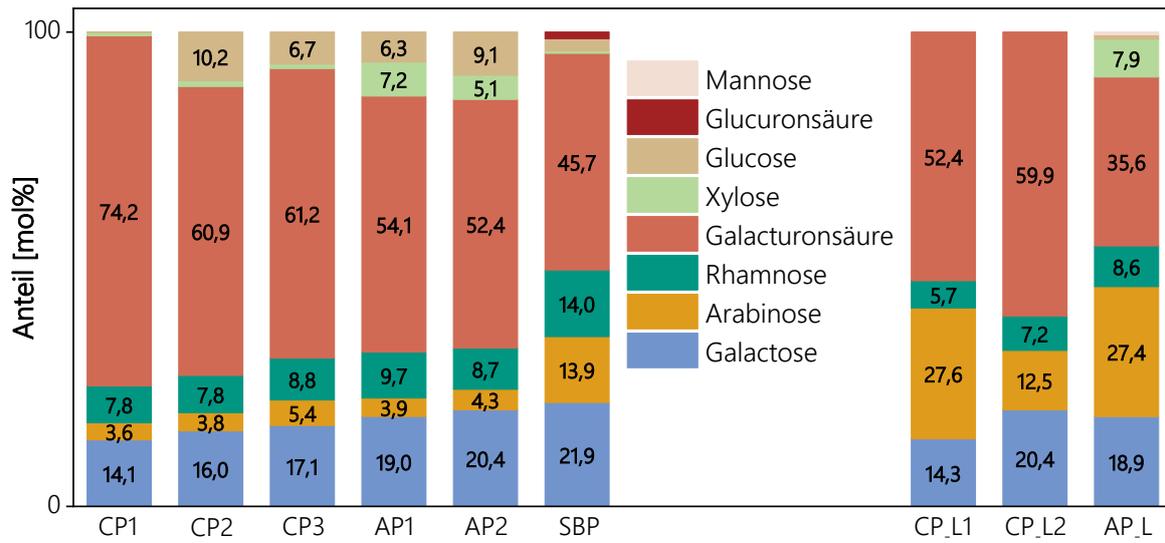


Abbildung 17: Monosaccharidzusammensetzung (in mol%, n=3) der in dieser Arbeit untersuchten kommerziellen und labortechnisch extrahierten Pektine. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Standardabweichungen aller dargestellten Werte liegen unter 5 %. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP-L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP-L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

Mit den Daten der Methylierungsanalyse (vgl. Tabelle 2) kann über das Verhältnis der PMAA von 1,2,4-Rhamnopyranose zum Gesamtanteil an rhamnosebasierten PMAA zusätzlich der Substitutionsgrad des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane abgeschätzt werden. So weisen CP1 - 3 sowie CP-L1 mit einem Anteil an 1,2,4-Rhamnose von etwa 25 - 30 % einen vergleichsweise geringen Substitutionsgrad auf. Bei SBP und AP-L liegen dagegen mit einem Anteil von ca. 48 - 50 % etwa die Hälfte der Rhamnoseeinheiten im Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane mit neutralen Seitenketten substituiert vor. Insgesamt ist zu beachten, dass die molaren Gesamtanteile der Rhamnose nach Methylierungsanalyse bei einem Vergleich der Pektine untereinander nicht die gleichen Trends aufweisen wie die molaren Anteile der Rhamnose nach Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzungen. So weist beispielsweise SBP in der Monosaccharidzusammensetzung den höchsten Anteil an Rhamnose im Vergleich zu den anderen Pektinen auf. Bei dem Gesamtanteil der rhamnosebasierten PMAA zeigt dahingegen CP1 mit 27,8 mol% den größten Anteil an den gesamten PMAA auf. SBP liegt mit 17,3 mol% deutlich unterhalb dieses Werts.

4.2. Strukturelle Charakterisierung der Pektine

Tabelle 2: Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA, in mol%, n = 2) aus den Daten der Methylierungsanalyse der in dieser Arbeit untersuchten sechs kommerziellen Pektine und drei labortechnisch extrahierten Pektine. Die Analyse der PMAA erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) mit massenspektrometrischem Detektor (MS) und Flammenionisationsdetektor (FID). Dargestellt sind die Pektin-charakteristischen Monomereinheiten. Die vollständigen Daten inklusive Range/2 und PMAA der Glucose sind in Tabelle B 8 im Anhang gezeigt. Ara: Arabinose, AP: Apfelpektin, AP-L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: Citruspektin, CP-L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, f: Furanose, Gal: Galactose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, Xyl: Xylose, -: nicht detektiert

Pektine	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP	CP-L1	CP-L2	AP-L
t-Araf	11,0	5,5	11,2	9,4	7,4	17,3	20,4	17,1	14,7
1,5-Araf / 1,4-Arap	15,9	13,3	16,1	17,4	11,0	16,7	43,2	26,1	34,0
1,3,5-Araf	1,4	-	-	3,6	0,9	5,1	8,8	4,8	7,1
1,2,5-Araf	2,2	2,7	2,0	0,7	1,4	2,0	3,5	3,2	2,0
1,3-Araf	-	-	-	-	-	2,2	-	-	-
Σ Ara	30,5	32,2	29,3	31,1	20,7	43,3	75,9	51,2	57,7
t-Galp	9,2	11,4	9,7	7,9	8,7	10,2	2,7	4,8	6,2
1,3-Galp	-	-	-	-	-	2,7	1,0	1,8	1,5
1,4-Galp	26,1	31,7	29,0	13,9	25,6	11,7	11,6	26,9	11,6
1,6-Galp	-	-	-	-	-	7,2	-	-	-
1,4,6-Galp	-	-	-	-	-	3,5	-	-	0,9
Σ Gal	35,3	43,1	38,7	21,8	34,3	31,8	15,3	33,5	19,3
1,2-Rhap	19,5	12,7	16,8	11,2	8,8	9,4	6,2	10,2	6,3
1,2,4-Rhap	8,3	5,1	5,8	6,1	5,3	8,7	2,6	5,0	6,3
Σ Rha	27,8	17,8	22,6	17,3	14,1	18,1	8,8	15,3	12,5
t-Xylp	-	-	-	6,9	5,5	-	-	-	5,5
1,4-Xylp	-	-	-	2,1	1,8	-	-	-	2,3
1,2-Xylp	-	-	-	0,6	0,6	-	-	-	-
Σ Xyl	-	-	-	9,6	7,9	-	-	-	7,8

Werden die Monosaccharide Arabinose und Galactose der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane betrachtet, ist auffällig, dass deren Gesamtanteil bezogen auf die Summe aller bestimmbarer Monosaccharide insbesondere bei CP1 - 3 und AP1 - 2 mit 17,7 - 24,7 mol% vergleichsweise gering ausfällt. Bei den anderen Pektinen ist dieser Anteil mit 32,9 - 46,3 mol% teilweise deutlich höher. Werden die Anteile an Arabinose und Galactose einzeln betrachtet, so

4. Ergebnisse und Diskussion

ist bei den kommerziell hergestellten Pektinen sowie bei CP-L2 die Galactose mit einem Anteil von 14,1 - 21,9 mol% dominierend. Der Arabinoseanteil ist bei CP1 - 3 sowie AP1 - 2 mit 3,6 - 5,4 mol% vergleichsweise gering. Dies ist vermutlich auf die harschen Extraktionsbedingungen bei hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werten zurückzuführen. Dadurch werden die säurelabileren glykosidischen Bindungen zwischen den Arabinofuranoseeinheiten teilweise gespalten, was in der Verringerung des Arabinoseanteils resultiert (Kravtchenko *et al.* 1992b). SBP ist als einziges der untersuchten kommerziell hergestellten Pektine mit 14,0 mol% durch einen vergleichsweise hohen Anteil an Arabinose gekennzeichnet und ist in den Anteilen an Arabinose und Galactose mit CP-L2 vergleichbar. Die Pektine CP-L1 und AP-L zeichnen sich dahingegen durch Arabinose als dominierendes Monosaccharid der neutralen Seitenketten aus (27,6 mol% bzw. 27,4 mol%), was sie deutlich von den anderen Pektinen unterscheidet. Bei Betrachtung der glykosidischen Bindungen in den Polysacchariden zeigen sich für die (Arabino-)Galactanstruktureinheiten der untersuchten Pektine überwiegend terminale und 1,4-substituierte Galactoseeinheiten, was auf überwiegend lineare Typ I (Arabino-)Galactanstruktureinheiten sowohl für die kommerziellen als auch für die labortechnisch extrahierten Pektine hindeutet. Dies wird durch die Ergebnisse des enzymatischen Profilings der (Arabino-)Galactanstrukturen bestätigt, welche in Tabelle 3 in Zusammenhang mit Abbildung B 2 im Anhang dargestellt sind. Dabei ist bei allen Pektinen das Disaccharid aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften Galactoseeinheiten mit 87,3 - 97,9 mol% die dominierende Einheit. Die Disaccharide, welche terminale (G-2b) bzw. interne β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpfte Arabinopyranoseeinheiten (G-2c) in den Typ I (Arabino-)Galactanen repräsentieren, sind lediglich mit geringen Anteilen von unter 8 mol% in den Pektinen enthalten. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur, in welcher Apfel- und Zuckerrübenpektine hinsichtlich ihrer (Arabino-)Galactanstrukturen untersucht wurden. Dabei konnten ebenfalls hochlineare Typ I (Arabino-)Galactanketten nachgewiesen werden (Wefers *et al.* 2018; Bindereif *et al.* 2021).

Tabelle 3: Anteile der freigesetzten (Arabino-)Galactanligosaccharide (GN-OS, in mol% \pm Range/2 [%], n = 2) nach Inkubation der in dieser Arbeit untersuchten sechs kommerziellen und der drei labortechnisch extrahierten Pektine mit *endo*-Galactanase. Die Strukturen der GN-OS sind in Abbildung B 2 im Anhang dargestellt. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP.L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, -: nicht detektiert

Pektine	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP	CP.L1	CP.L2	AP.L
GN-OS									
G-2a	94,2 \pm 0,5	93,6 \pm 1,5	94,7 \pm 0,3	94,7 \pm 0,3	87,3 \pm 3,4	95,7 \pm 0,3	97,7 \pm 0,1	97,9 \pm 0,1	95,8 \pm 0,1
G-2b	3,9 \pm 0,5	4,0 \pm 1,3	3,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,1	5,6 \pm 3,4	2,0 \pm 0,1	3,2 \pm 1,0	2,1 \pm 0,1	6,6 \pm 2,3
G-2c	1,9 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1	5,0 \pm 0,3	7,1 \pm 0,1	2,4 \pm 0,3	-	-	-

4.2. Strukturelle Charakterisierung der Pektine

Daneben können über die Ergebnisse der Methylierungsanalyse Rückschlüsse über Länge der (Arabino-)Galactanseitenketten gezogen werden. Dies ist über das Verhältnis der Anteile an 1,4-verknüpften zu terminalen Galactopyranoseeinheiten möglich. Dabei sind für AP1, SBP und AP-L mit einem entsprechenden Verhältnis von 1,2 - 1,8 : 1 vergleichsweise kurze Kettenlängen nachweisbar, während CP1 - CP3 und AP2 mit einem Verhältnis von 2,8 - 3,0 : 1 längere Ketten aufweisen. Für CP.L1 und CP.L2 belaufen sich die Verhältnisse auf 4,3 : 1 bzw. 5,6 : 1. So weisen diese beiden Pektine vermutlich die längsten (Arabino-)Galactanketten der in dieser Arbeit untersuchten Pektine auf. Insgesamt ist bei diesen Verhältnissen zu beachten, dass es sich lediglich um eine Abschätzung der durchschnittlichen Kettenlänge handelt und die ermittelten Werte nicht der tatsächlichen Kettenlänge entsprechen. Dabei ist zu erwähnen, dass der Aufbau der (Arabino-)Galactanseitenketten in den einzelnen Pektinen nicht übergreifend gleich ist. So können die an das Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane verknüpften (Arabino-)Galactanketten innerhalb eines Pektinextraktes unter anderem unterschiedliche Kettenlängen aufweisen. Als vergleichender Wert zur Abschätzung von Unterschieden in den durchschnittlichen Kettenlängen der Typ I (Arabino-)Galactane in verschiedenen Pektinen sind die Verhältnisse dennoch geeignet.

Für die labortechnisch extrahierten Pektine wurde bei der Analyse der glykosidischen Bindungsverhältnisse mit 1,0 - 1,8 mol% zusätzlich ein geringer Anteil an 1,3-verknüpfter Galactopyranose nachgewiesen. Dies ist vermutlich auf das lineare Rückgrat der Typ II (Arabino-)Galactane zurückzuführen. Bei AP-L konnte zusätzlich ein geringer Anteil an 1,3,6-verknüpfter Galactopyranose nachgewiesen werden. Bei Abwesenheit von 1,6-verknüpften Galactoseeinheiten deutet dies auf die Substitution mit terminalen, monomeren Galactopyranoseeinheiten am Rückgrat der Typ II (Arabino-)Galactane hin. Bei SBP konnte mit 2,7 mol% ein geringfügig höherer Anteil an 1,3-Galactose nachgewiesen werden. Über die Anteile an 1,3,6- (3,5 mol%) und 1,6-Galactose (7,2 mol%) kann bei SBP auf einen hohen Substitutionsgrad der Typ II (Arabino-)Galactane mit längeren Seitenketten geschlossen werden. Dies steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten zu Zuckerrübenpektinen, welche ebenfalls einen vergleichsweise hohen Anteil an Verzweigungen und längeren Seitenketten in den Typ II (Arabino-)Galactanen beschreiben (Bindereif *et al.* 2021).

Bei Betrachtung der arabinosebasierten PMAA ist für alle Pektine ein hoher Anteil an terminalen- und 1,5-verknüpften Arabinofuranoseeinheiten erkennbar. Zusammen mit den geringen Anteilen an 1,2,5- und 1,3,5-verknüpften Arabinoseeinheiten von CP1 - CP3 sowie AP1 und AP2 mit insgesamt 2,0 - 4,4 mol% deutet dies auf überwiegend lineare Arabinanstruktureinheiten in den kommerziellen Apfel- und Citruspektinen hin. Dies wird durch die Daten der enzymatisch freigesetzten Arabinan oligosaccharide weitgehend bestätigt (vgl. Tabelle 4 in Zusammenhang mit Abbildung B 1 im Anhang). Lediglich CP1 und AP1 weisen unter den genannten Pektinen mit A-3b (5,9 mol% bzw. 11,9 mol%) und A-5a (1,6 mol% bzw. 2,7 mol%) etwas höhere Anteile an

4. Ergebnisse und Diskussion

verzweigten Arabinanstruktureinheiten auf. Dabei kann A-3b als Nebenprodukt der enzymatischen Hydrolyse freigesetzt werden. Auch ist eine partielle Degradierung der Arabinane im Zuge der Pektinextraktion möglich, wonach das Fragment A-3b nicht als Nebenprodukt klassifiziert wird. Vielmehr ist so eine Zuordnung zu den Produkten der α -(1→5)-hydrolytischen Spaltung der teilweise abgebauten Arabinane möglich.

Tabelle 4: Anteile der freigesetzten Arabinanoligosaccharide (AN-OS, in mol% \pm Range/2 [%], n = 2) nach Inkubation der neun Pektine mit *endo*-Arabinanase. Die Strukturen der AN-OS sind in Abbildung B 1 im Anhang dargestellt. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP-L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP-L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, -: nicht detektiert

Pektine	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP	CP.L1	CP.L2	AP.L
AN-OS									
A-2a	54,4 \pm 0,5	82,3 \pm 0,1	42,5 \pm 7,1	56,7 \pm 1,0	47,9 \pm 5,6	49,2 \pm 0,1	70,8 \pm 0,1	64,1 \pm 0,5	67,4 \pm 0,3
A-2b	-	-	-	-	10,0 \pm 0,1	-	0,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
A-3a	30,8 \pm 0,8	-	55,1 \pm 6,0	18,8 \pm 0,4	31,5 \pm 0,2	2,3 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2	6,6 \pm 0,3	6,3 \pm 0,1
A-3b	5,6 \pm 0,1	-	-	11,9 \pm 0,3	18,9 \pm 0,1	23,2 \pm 0,2	3,0 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
A-4a	5,3 \pm 0,1	12,0 \pm 0,1	2,9 \pm 1,5	7,7 \pm 0,1	-	14,2 \pm 0,1	12,5 \pm 0,1	15,7 \pm 0,2	11,8 \pm 0,1
A-4b	2,3 \pm 0,1	5,7 \pm 0,1	1,9 \pm 0,9	2,1 \pm 0,1	-	1,0 \pm 0,1	2,2 \pm 0,2	5,2 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
A-5a	1,6 \pm 0,1	-	-	2,7 \pm 0,1	-	2,1 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1
A-5b	-	-	-	-	-	-	0,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1
A-5c	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,1
A-6b	-	-	-	-	-	-	0,6 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	1,5 \pm 0,5
A-7a	-	-	-	-	-	3,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1
A-7b	-	-	-	-	-	4,4 \pm 0,2	4,3 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1

4.2. Strukturelle Charakterisierung der Pektine

Die labortechnisch extrahierten Pektine sind ebenfalls überwiegend durch lineare Arabinane gekennzeichnet, weisen allerdings einen leicht höheren Anteil an verzweigten arabinosebasierten PMAA auf. Auch die Ergebnisse des enzymatischen Arabinan-Profilings zeigen höhere Anteile an verzweigten Arabinan oligosacchariden, insbesondere bei CP-L2. So weist dieses einen Anteil von 15,7 mol% bzw. 5,2 mol% der einfach in Position O-3 bzw. O-2 verzweigten Tetrasaccharide A-4a bzw. A-4b auf. Zusätzlich wurden beim Arabinanprofilung mit 1,3 mol% bzw. 3,1 mol% die hochverzweigten Arabinanstrukturen A-7a bzw. A-7b freigesetzt. Diese sind jeweils mit zwei Arabinofuranoseeinheiten innerhalb des Heptasaccharids in Position O-3 substituiert. Insgesamt dominieren somit bei CP-L2 die Verzweigungen der Arabinane in Position O-3. Dies deckt sich mit den Daten der glykosidischen Bindungsverhältnisse von CP-L2, bei welchen ein höherer Anteil an 1,3,5-verknüpften Arabinofuranoseeinheiten (4,8 mol%) nachgewiesen wurde als an 1,2,5-verknüpfte Arabinosen (3,2 mol%).

Lediglich bei SBP wurden bei der enzymatischen Behandlung mit *endo*-Arabinanase höhere Anteile an verzweigten Arabinan oligosacchariden freigesetzt als bei den labortechnisch extrahierten Pektinen. So wurden hierbei unter anderem 3,7 mol% bzw. 4,4 mol% an A-7a bzw. A-7b semiquantitativ bestimmt. Insgesamt dominieren in den Arabinanen von SBP auf Grundlage der Daten des enzymatischen Arabinan-Profilings wiederum die Verzweigungen in Position O-3. Dies wird durch die molaren Anteile der arabinosebasierten PMAA nach Methylierungsanalyse von SBP bestätigt, wobei 5,1 mol% an 1,3,5- und 2,0 mol% an 1,2,5-verknüpfter Arabinofuranose nachgewiesen wurden. Zusätzlich deutet der Anteil an 1,3-verknüpfter Arabinofuranose auf di- und oligomere Seitenketten hin, welche an das α -(1 \rightarrow 5)-glykosidisch verknüpfte Rückgrat der Arabinane gebunden vorliegen. Die hochverzweigte Struktur von Zuckerrübenpektinen konnte bereits in der Literatur gezeigt werden, wobei zusätzlich zu den hier nachgewiesenen Strukturen unter anderem auch vierfach substituierte 1,2,3,5-Arabinofuranoseeinheiten beschrieben wurden (Westphal *et al.* 2010b; Bindereif *et al.* 2021). Durch das Bilden des Verhältnisses aus terminalen Ketteneinheiten (abzüglich der Anteile mehrfachsubstituierter arabinosebasierter PMAA) zum Rückgrat der Arabinane ist entsprechend der Formel 1 im Anhang eine Abschätzung der mittleren Kettenlänge des Rückgrats der Arabinane möglich. Bei einem Vergleich der Pektine untereinander wurden für CP1, CP3, AP2 und SBP mit 3,0 - 3,6 die geringsten Werte für die Länge des Rückgrats erhalten. CP-L1 und AP-L wiesen mit Werten von 7,6 bzw. 8,7 die längsten Arabinanseitenketten auf. Dabei ist wiederum zu beachten, dass es sich bei den Werten lediglich um Annäherungen handelt und diese nicht den tatsächlichen Kettenlängen der Arabinane entsprechen. Als vergleichender Parameter zwischen untersuchten Pektinen sind sie dennoch geeignet.

Als weitere Besonderheit ist für SBP als einziges der untersuchten Pektine Glucuronsäure in der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide nach saurer Hydrolyse nachweisbar. Ein möglicher Ursprung ist die Substitution der Galacturonsäureeinheiten des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane mit Glucuronsäure. Dies wurde bereits von Renard und Mitarbeitenden

4. Ergebnisse und Diskussion

gezeigt, wobei eine monomere Substitution in Position O-3 der Galacturonsäureeinheiten nachweisbar war (Renard *et al.* 1999). Diese Vermutung konnte über eine Bestimmung der Bindungstypen in den Polysacchariden nach Carboxylreduktion bekräftigt werden (s. Tabelle B 9 im Anhang). Dabei war sowohl das PMAA der 1,3,4-substituierten Galacturonsäure mit einem Anteil von 2,7 mol% als auch das PMAA der terminalen Glucuronsäure mit einem Anteil von 2,2 mol% nachweisbar.

Zusätzlich wurde für alle kommerziell hergestellten Pektine außer CP1 ein unterwartet hoher Anteil an Glucose nachgewiesen, was wiederum auf eine Co-Extraktion von nicht-Pektinstruktureinheiten hindeutet. Dieser kann über die Daten der Methylierungsanalyse überwiegend 1,4-verknüpfter Glucopyranoseeinheiten zugeordnet werden, was auf das Auftreten von Stärke, Cellulose oder Xyloglucanen hindeutet.

Als weitere strukturelle Parameter zur Charakterisierung der unterschiedlichen Pektine wurden die Methylierung und Acetylierung der polymergebundenen Galacturonsäureeinheiten betrachtet. Dabei heben sich die Pektine CP2 und CP3 mit einem DM von 4,4 bzw. 5,0 % durch geringe Methylveresterung von den anderen Pektinen ab (vgl. Tabelle 5). Die restlichen kommerziellen Pektine weisen einen DM zwischen 52,1 und 68,9 % auf, während bei den labortechnisch extrahierten Pektinen mit etwa 90,0 - 102,6 % rechnerisch nahezu alle Galacturonsäureeinheiten methyliert vorliegen. Bei der Betrachtung der Werte ist zu beachten, dass der Gehalt an Galacturonsäure nach schwefelsaurer Hydrolyse colorimetrisch bestimmt wird und dieser durch Faktoren wie beispielsweise eine unvollständige Hydrolyse unterbestimmt werden kann.

Tabelle 5: Methylierungsgrad (DM), Acetylierungsgrad (DAc), gewichtsgemittelttes Molekulargewicht (M_w), Aschegehalt und Proteingehalt der in dieser Arbeit untersuchten sechs kommerziellen und drei labortechnisch extrahierten Pektine (\pm Range/2 [%], $n = 2$). AP: kommerzielles Apfelpektin, AP-L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP-L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

Pektine	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP	CP.L1	CP.L2	AP.L
DM [%]	66,1 $\pm 3,9$	4,4 $\pm 0,4$	5,0 $\pm 0,1$	68,9 $\pm 3,0$	57,0 $\pm 1,5$	52,1 $\pm 3,3$	102,6 $\pm 6,8$	91,3 $\pm 1,2$	90,0 $\pm 6,4$
DAc [%]	1,4 $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,1$	0,3 $\pm 0,1$	1,3 $\pm 0,1$	1,4 $\pm 0,1$	23,1 $\pm 2,1$	3,0 $\pm 0,2$	2,9 $\pm 0,1$	13,2 $\pm 0,7$
M_w [kDa]	149 ± 11	38 ± 7	58 ± 2	222 ± 8	47 ± 6	417 ± 47	67 ± 7	222 ± 6	266 ± 5
Aschegehalt [%]	2,9 $\pm 0,2$	15,2 $\pm 0,1$	17,0 $\pm 0,2$	7,9 $\pm 0,1$	6,0 $\pm 0,2$	5,1 $\pm 0,1$	3,9 $\pm 0,1$	2,6 $\pm 0,3$	4,0 $\pm 0,8$
Proteingehalt [%]	1,1 $\pm 0,1$	6,0 $\pm 0,1$	3,1 $\pm 0,1$	0,4 $\pm 0,1$	8,2 $\pm 0,1$	5,1 $\pm 0,1$	1,4 $\pm 0,1$	3,0 $\pm 0,1$	3,3 $\pm 0,1$

Der DAc der untersuchten Pektine ist mit maximal 3,0 % bei den meisten Pektinen gering, was entsprechend der Literatur von Voragen und Mitarbeitenden (1986) ist. Deren ermittelte Werte für den DAc von Apfel- und Citruspektinen lag zwischen 1 und 4 %. Für Zuckerrübenpektine wurden dahingegen in der Literatur bereits hohe DAc der Galacturonsäureeinheiten beschrieben (Bindereif *et al.* 2021). Dies spiegelt sich auch in den hier erhaltenen Ergebnissen wieder, wobei für SBP ein DAc von 23,1 % ermittelt wurde. Mit 13,2 % liegen auch die polymergebundenen Galacturonsäureeinheiten von AP-L vergleichsweise hoch acetyliert vor.

Zusätzlich sind zwischen den Pektinen Unterschiede im M_w auszumachen (vgl. Tabelle 5). Dabei weisen CP2 und CP3 sowie AP2 und CP-L1 mit 38 - 67 kDa ein vergleichsweise geringes Molekulargewicht auf. AP1, CP-L2 und AP-L liegen mit 222 bzw. 266 kDa in einem ähnlichen Molekulargewichtsbereich, während sich SBP mit etwa 420 kDa durch ein unerwartet hohes M_w auszeichnet. Bei zusätzlicher Betrachtung der Molekulargewichtsverteilung (s. Abbildung B 3 im Anhang) ist für alle Pektine eine polymodale Verteilung zu sehen. Diese ist typisch für natürliche, nicht lineare Polysaccharide. So setzen sich Pektine nicht aus den gleichen, sich wiederholenden Struktureinheiten zusammen, sondern weisen unterschiedlich lange und komplexe Fraktionen auf. Dadurch werden sie von Struktureinheiten unterschiedlicher hydrodynamischer Volumina geprägt, was in einer polymodalen Verteilung resultiert.

Neben Kohlenhydraten können in den gewonnenen Pektinpräparaten Begleitkomponenten wie co-extrahierte Salze und Proteine enthalten sein. Bei hohen Anteilen dieser Bestandteile können die Ergebnisse der Fermentationsprozesse in ihrer Aussagekraft gemindert werden, da durch Salze und Proteine die Menge an tatsächlich eingesetztem Pektin verringert wird. Insbesondere bei CP2 und CP3 ist mit 15,2 5 bzw. 17,0 % ein vergleichsweise hoher Aschegehalt nachweisbar. Dies ist vermutlich auf den geringen DM dieser Pektine zurückzuführen. Durch das Vorliegen der freien Carboxygruppen im Pektin ist bei Dissoziation der Säure eine erhöhte Bindung von Kationen möglich, welche bei der Aschebestimmung erfasst werden. Zusätzlich kann der Aschegehalt durch mögliche präzipitierte Salze aus dem Extraktionsmittel beeinflusst werden. Auch der Proteingehalt erweist sich als unterschiedlich zwischen den untersuchten Pektinen. Insbesondere bei CP2, AP2 und SBP liegen die Gehalte mit 5,1 - 8,2 % vergleichsweise hoch. Bei SBP kann dies vermutlich teilweise auf Arabinogalactanproteine zurückgeführt werden, welche an Typ II (Arabino-)Galactane gebunden vorliegen können. Die restlichen Pektine weisen mit maximal 3,3 % einen moderaten Proteingehalt auf.

4.3. ENZYMATISCHE FERMENTATION

Um erste Informationen für die weiteren *in vitro* und *in vivo* Fermentationsstudien zu erhalten, wurden im Rahmen der Masterarbeit von Hannah Dräger (geb. Gaul) zunächst ausgewählte Standardsubstanzen einzelner Pektinstruktureinheiten und die sechs kommerziellen Pektine in einem vereinfachten enzymatischen *in vitro* Fermentationsmodell untersucht. Dafür wurden die

4. Ergebnisse und Diskussion

zellwandabbauenden Multienzymkomplexe Driselase und Viscozyme L eingesetzt und die Pektine über verschiedene Zeiten (0 h, 0,5 h, 4 h und 16 h) inkubiert (vgl. Kapitel 3.4.1.). Die Identifizierung der dabei erzeugten kohlenhydratbasierten Fermentationsprodukte erfolgte anhand spezifischer m/z der Lithiumaddukte sowie Retentionszeiten aus HPAEC-PAD/MS-basierten Analysen. Um den Fortschritt der enzymatischen Hydrolyse zu beurteilen, wurden zusätzlich die Molekulargewichtsverteilungen der partiell degradierten Pektine betrachtet (Gaul 2020).

4.3.1. Betrachtung des Fermentationsverlaufs und der freigesetzten Oligosaccharide durch Driselase

Durch die enzymatische Fermentation der Standardsubstanzen (lineares Arabinan, verzweigtes Arabinan, Galactan und Rhamnogalacturonan, vgl. Tabelle B 10 im Anhang) mit Driselase wurden Fermentationsprodukte erzeugt, die zur Identifizierung der Zwischenprodukte nach enzymatischer Behandlung der Pektine beitragen sollen. Die Chromatogramme der HPAEC-PAD/MS-basierten Analysen samt Zuordnung der Fermentationsprodukte sind in Abbildung B 4 im Anhang dargestellt. Nach enzymatischer Behandlung der (linearen) Arabinane war es möglich, Arabinan oligosaccharide bis DP 7 nachzuweisen. Die dimeren Arabinanstrukturen sind dabei in zwei Isomeren aufgetreten, was an den unterschiedlichen Retentionszeiten von etwa 20 min und 22 min zu sehen ist. Über einen Retentionszeitvergleich mit oligomeren Standardsubstanzen wurde die nach 22 min eluierende Verbindung als ein α -(1→5)-verknüpftes Arabinofuranosedimer identifiziert. Die Ermittlung der Struktur des zweiten Dimers war über die durchgeführte Analyse nicht möglich. Bei dem enzymatisch behandelten Galactan war eine eindeutige Zuordnung der freigesetzten Galactan oligosaccharide anhand des m/z lediglich bis DP 5 möglich. Aus Rhamnogalacturonan als Standardsubstanz konnten neben Oligosacchariden der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane zusätzlich monomere Galacturonsäure und ein Dimer aus Rhamnose und Galactose nachgewiesen werden. Eine Zuordnung weiterer für Typ I Rhamnogalacturonane charakteristischer Strukturen war über die enzymatische Fermentation der polymeren Standardsubstanzen allerdings nicht möglich.

Die enzymatische Fermentation der kommerziellen Pektine resultierte überwiegend in der Freisetzung von (Arabino-)Galactanstrukturen als Bestandteile der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane (vgl. Abbildung 18). Dabei konnten für alle Pektine Galactan oligosaccharide bis DP 5 nachgewiesen werden. Die insgesamt geringen Anteile an freigesetzten Arabinan oligosacchariden sind vermutlich auf den niedrigen Gesamtanteil an Arabinose in den kommerziellen Pektinen zurückzuführen. Über die Retentionszeit sowie das m/z konnte lediglich die α -(1→5)-glykosidisch verknüpfte Arabinobiose nachgewiesen werden, welche mit einem Tetramer, bestehend aus Galactoseeinheiten, co-eluiert. Zusätzlich zu den Abbauprodukten der neutralen Seitenketten wurde mit einem Tetramer aus zwei Rhamnose- und zwei Galacturon-

säureeinheiten ($m/z = 669$) ein Bruchstück vom Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane identifiziert. Als weitere enzymatisch freigesetzte Oligosaccharide wurden mono-, di- und oligomere Strukturen der Galacturonsäure nachgewiesen. Während das Monomer sowohl über die Retentionszeit ($t = 38,7$ min) als auch über die Massenspur ($m/z = 201$) identifiziert wurde, wurden die Oligomere lediglich über Vergleich der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen zugewiesen. Insgesamt ist bei den erzielten Ergebnissen zu beachten, dass bei Einsatz von Driselase unter den hier angewandten Bedingungen lediglich geringe Mengen an Pektinoligosacchariden aus den Pektinen AP1 und AP2 freigesetzt wurden. Dies wurde auch durch die Molekulargewichtsverteilungen nach Enzyminkubation bestätigt, bei welchen nur geringe Unterschiede in Abhängigkeit von den verschiedenen Inkubationszeiten auszumachen waren (vgl. Abbildung B 5 im Anhang).

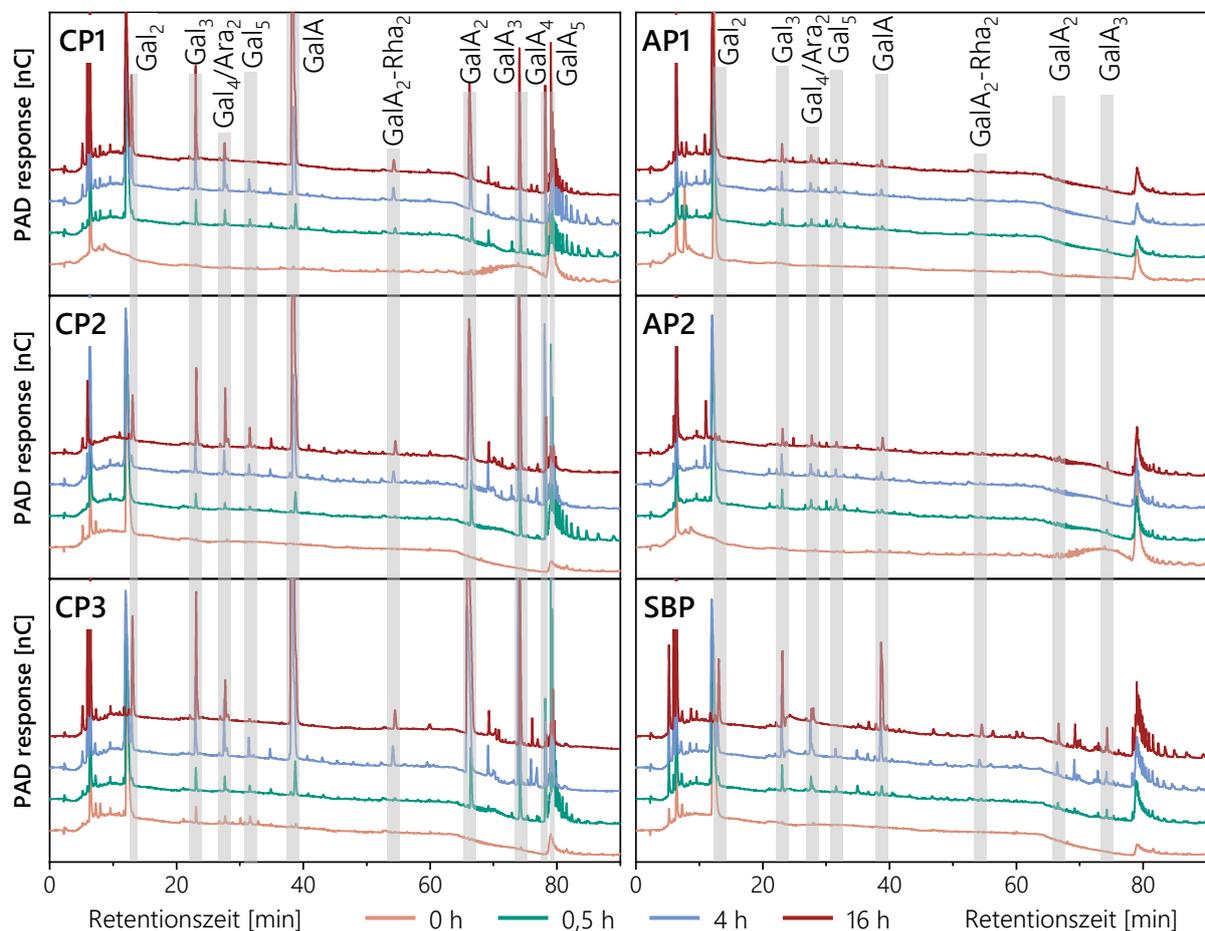


Abbildung 18: Chromatogramme der sechs kommerziellen Pektine nach enzymatischer Fermentation mit Driselase über verschiedene Zeiten. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigten Mono-, Di- und Oligosaccharide wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Die zugehörigen Signale sind durch graue Balken gekennzeichnet. AP: kommerzielles Apfelpektin, Ara_x: Arabinose(-oligosaccharide), CP: kommerzielles Citruspektin, Gal_x: Galactose(-oligosaccharide), GalA_x: Galacturonsäure(-oligosaccharide), Rha_x: Rhamnose(-oligosaccharide), SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, x: Anzahl der monomeren Einheiten

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei Betrachtung der Signalintensitäten der Arabinan- und (Arabino-)Galactanoligosaccharide sind teilweise Unterschiede zwischen den Pektinen zu sehen. Während deren Intensitäten bei CP2 und CP3 stetig zunehmen, verringert sich die Intensität einzelner Oligosaccharide bei CP1 und SBP nach 16-stündiger Inkubationszeit. Dies deutet auf eine langsamere Umsetzung der verfügbaren Arabinane und (Arabino-)Galactane bei CP1 und SBP hin. Da die unfermentierten Polysaccharide allerdings nicht weiter strukturcharakterisiert wurden, kann die Hypothese nicht abschließend bestätigt werden. Die Freisetzung der galacturonsäurebasierten Verbindungen nimmt pektinunabhängig über die Zeit kontinuierlich zu, was die vergleichsweise hohen Anteile an Homogalacturonanen widerspiegelt. Aufgrund der hohen Substratverfügbarkeit können so bis zu einer Fermentationszeit von 16 h Oligosaccharide aus den Pektinen freigesetzt werden. Zusätzlich werden die höheren Oligosaccharide in kleinere Oligomere abgebaut, wodurch eine stetige Veränderung der Anteile bedingt wird. Die strukturellen Veränderungen bis zu 16 h spiegeln sich auch in den Molekulargewichtsverteilungen der Fermentationslösungen wider (vgl. Abbildung B 5 im Anhang). Diese verschieben sich für alle Pektine außer AP1 - 2 fortlaufend hin zu geringeren Molekulargewichtsverteilungen. Für SBP ist diese Verteilung nach 16 h im Vergleich zu den restlichen Pektinen deutlich breiter. Zusätzlich eluieren hier bereits Polysaccharide nach 12,7 min, was im Vergleich zu den anderen Pektinen höhermolekulare Strukturen für SBP nach 16 h Fermentationszeit zeigt. Dies deutet auf eine langsamere Fermentation von SBP unter Einsatz von Driselase hin.

4.3.2. Betrachtung des Fermentationsverlaufs und der freigesetzten Oligosaccharide durch Viscozyme L

Bei Betrachtung der Molekulargewichtsverteilungen nach enzymatischer Behandlung der kommerziellen Pektine mit Viscozyme L ist für die Pektine CP1 - 3 eine ähnliche Verschiebung der Verteilungen hin zu geringeren Molekulargewichten zu beobachten (vgl. Abbildung B 6 im Anhang). Bei AP1 - 2 und SBP sind die Chromatogramme nach HPSEC-RI-basierter Analyse nach 30-minütiger Fermentation breiter als bei CP1 - 3, was auf eine potentiell langsamere Umsetzung der Pektine hindeutet. Zwischen den Fermentationszeitpunkten 4 h und 16 h sind keine großen Unterschiede in den Molekulargewichtsverteilungen der sechs untersuchten kommerziellen Pektine auszumachen, was durch eine weitgehende Umsetzung der enzymatisch zugänglichen Pektinstruktureinheiten erklärt werden kann. Bei der Betrachtung der freigesetzten Oligosaccharide sind überwiegend die gleichen Produkte wie nach enzymatischer Inkubation mit Driselase identifizierbar (vgl. Abbildung 19). Als Hauptunterschied zwischen den Fermentationsansätzen mit Viscozyme L und Driselase konnte eine erhöhte Freisetzung an Monosacchariden mit Viscozyme L ausgemacht werden. Dies ist auf eine vermehrte *exo*-Aktivität der in Viscozyme L enthaltenen pektinolytischen Enzyme zurückzuführen (Combo *et al.* 2012).

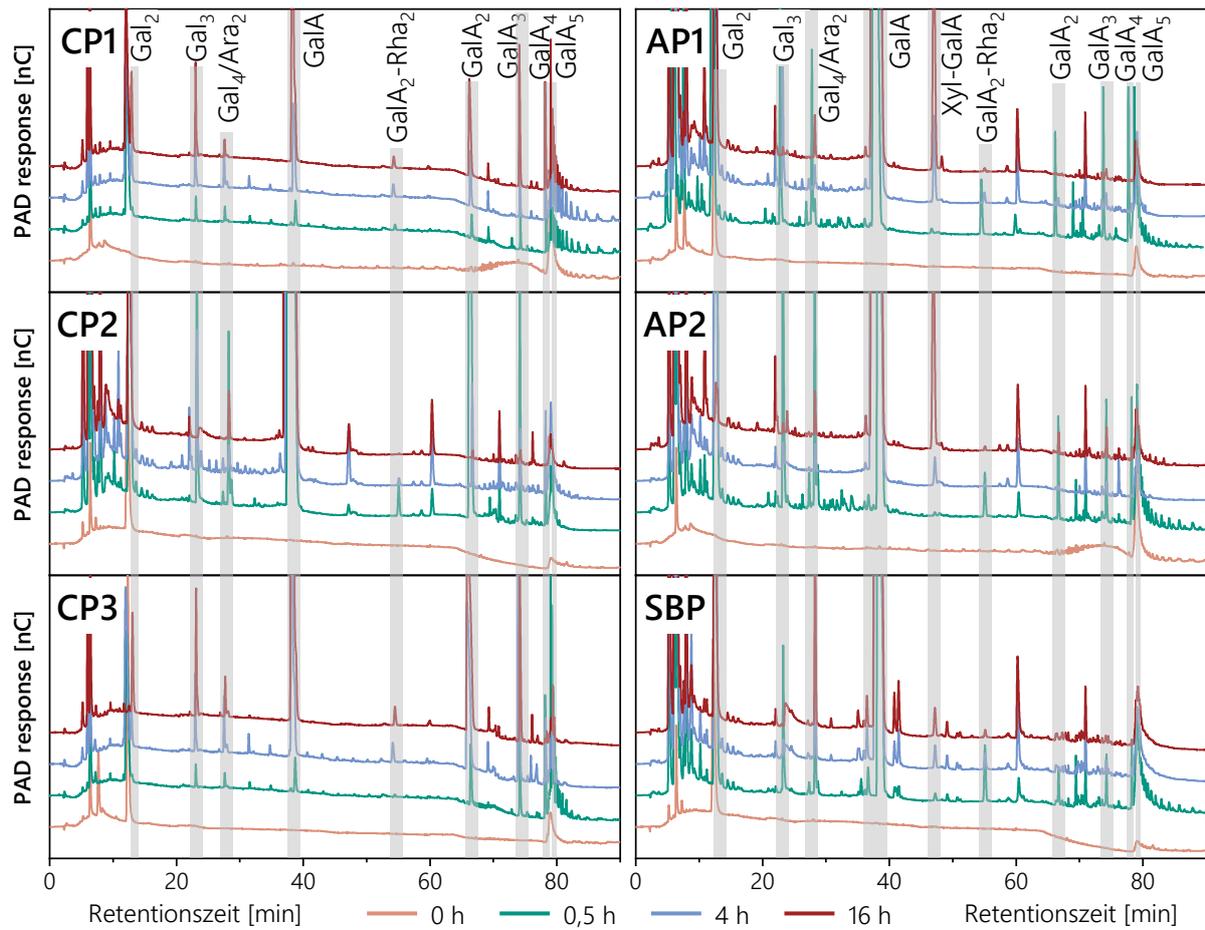


Abbildung 19: Chromatogramme der sechs kommerziellen Pektine nach enzymatischer Fermentation mit Viscozyme L über verschiedene Zeiten. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigten Mono-, Di- und Oligosaccharide wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Die zugehörigen Signale sind durch graue Balken gekennzeichnet. AP: kommerzielles Apfelpektin, Ara_x: Arabinose(-oligosaccharide), CP: kommerzielles Citruspektin, Gal_x: Galactose(-oligosaccharide), GalA_x: Galacturonsäure(-oligosaccharide), Rha_x: Rhamnose(-oligosaccharide), SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, x: Anzahl der monomeren Einheiten, Xyl: Xylose

Darüber hinaus wurde neben den bereits beschriebenen Strukturen bei beiden Apfelpektinen ein zusätzliches Signal bei 46,5 min mit einem m/z von 333 nachgewiesen. Dieses m/z kann sowohl dem Lithiumaddukt eines Dimers aus Rhamnose und Galactose als auch dem Lithiumaddukt eines Dimers aus Xylose und Galacturonsäure zugeordnet werden. Um eine eindeutige Zuordnung zu ermöglichen, wurde das Signal im semipräparativen Maßstab nach HPAEC-basierter chromatographischer Trennung isoliert und hinsichtlich der Monosaccharidzusammensetzung analysiert. Dabei wurde ein Anteil an Galacturonsäure von 44,8 mol% und ein Anteil an Xylose von 45,6 mol% ermittelt, was eine Zuordnung des Signals zum Dimer aus Xylose und Galacturonsäure ermöglicht. Mit 9,6 mol% war zusätzlich Glucose in der isolierten Fraktion nachweisbar, was vermutlich auf eine Signalüberlappung und somit auf eine Co-Isolierung einer anderen Verbindung zurückzuführen ist. Um die Identität des Dimers weiter abzusichern, wurde ein HSQC-NMR Spektrum aufgenommen, welches in Abbildung B 7 im Anhang dargestellt ist. Dabei war es über die anomeren Signale und einen Vergleich mit Literaturdaten (Schols *et al.* 1995a) möglich,

4. Ergebnisse und Diskussion

Galacturonsäure ($\delta_{H/C} = 5,41/92,70$ ppm) und Xylose ($\delta_{H/C} = 4,98/99,20$ ppm) als Monomereinheiten der Verbindung zu identifizieren. Für weitere 2D-NMR Experimente wie *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*-NMR war die Menge an isoliertem Material allerdings nicht ausreichend. So konnten keine weiterführenden Informationen über die glykosidische Bindung zwischen den Monomereinheiten erhalten werden. Allerdings erscheint eine Zuordnung dieser Verbindung als Xylogalacturonanstrukturelement logisch.

4.4. *IN VITRO* FERMENTATION DER PEKTINE MIT HUMANEN FÄZES

Für die *in vitro* Fermentationsversuche mit humanen Fäzesproben wurden alle in Kapitel 3.1. und 4.1. beschriebenen Pektine eingesetzt und mit einer Mischfäzessuspension für verschiedene Zeiten (10 min, 4 h, 24 h und 48 h) inkubiert. Die in den Fäzessuspensionen enthaltenen pektinbasierten Kohlenhydrate wurden durch das Einstellen eines Ethanolanteils von 80 % in Poly- und Oligosaccharide aufgetrennt und separat analysiert (vgl. Kapitel 3.5.).

4.4.1. Analyse der nicht fermentierten Polysaccharide

4.4.1.1. Gravimetrische Bestimmung

In Abbildung 20 sind die Daten zur gravimetrischen Bestimmung der unfermentierten Polysaccharide nach Fermentation dargestellt. Für eine verbesserte Vergleichbarkeit der Fermentationen der verschiedenen Pektine wurden die Mengen der nicht fermentierten Polysaccharide auf die Polysaccharidgehalte in den jeweiligen Blindproben (ohne Zugabe von humanen Fäzes) normiert. Die Daten spiegeln somit die anteilige Abnahme der ethanolunlöslichen Polysaccharide im Verlauf der *in vitro* Fermentation wider. Um zusätzlich einer möglichen Verfälschung der Polymerauswaagen durch ethanolunlösliche Strukturen aus den Fäzes und dem Fermentationsmedium vorzubeugen, wurde eine Kontrollprobe ohne Pektinzugabe mitgeführt. Die entsprechende Polymerauswaage wurde für eine Korrektur der nicht fermentierten Polysaccharide nach *in vitro* Fermentation der Pektine verwendet. Die Fermentation der labortechnisch hergestellten Pektine wurde zeitlich abweichend und daher mit unterschiedlichen Fäzesproben angesetzt als die Fermentation der kommerziellen Pektine. Um dennoch eine Vergleichbarkeit der beiden *in vitro* Fermentationsansätze beurteilen zu können, wurde bei der Untersuchung der labortechnisch extrahierten Pektine CP2 als Vergleichspektin mitgeführt.

Bereits nach 10-minütiger Fermentationszeit ist bei allen Proben eine Abnahme der nicht fermentierten Polysaccharidgehalte zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass der Abbau der polymeren Pektine bereits nach kurzen Fermentationszeiten beginnt. Bei CP1 und SBP ist dieser Abbau nach einer Fermentation von 10 min stärker ausgeprägt als bei den anderen Pektinen, was auf schnell fermentierbare Strukturen hinweist. Die labortechnisch extrahierten Pektine und AP2

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

zeigen dahingegen nach 10-minütiger Fermentation vergleichsweise geringe Unterschiede zu der Blindprobe, was eine langsamer beginnende Fermentation indiziert. Ein Vergleich der beiden Proben von CP2 zeigt mit 94,2 % bzw. 93,9 % eine vergleichbare Abnahme der gravimetrisch bestimmbaren Polysaccharide bezogen auf die Blindprobe. So kann die Vergleichbarkeit der *in vitro* Fermentationsansätze zu diesem Zeitpunkt als angemessen beurteilt werden.

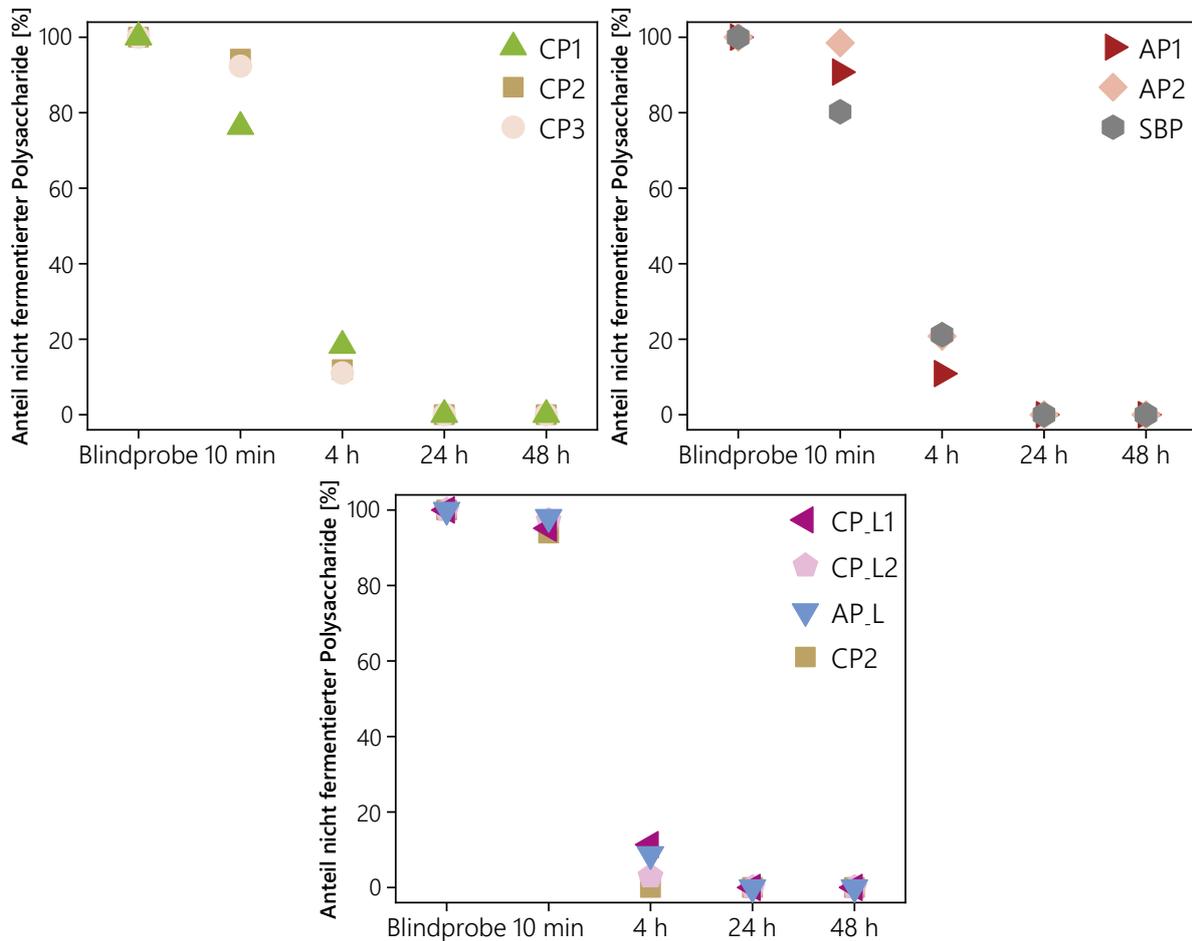


Abbildung 20: Ergebnisse der gravimetrischen Bestimmung der nicht fermentierten Pektinpolysaccharide nach *in vitro* Fermentation mit humanen Fäzesproben der sechs kommerziellen Pektine und der drei labortechnisch extrahierten Pektine über verschiedene Zeiten. Die gravimetrisch bestimmten Rückstände wurden auf die Rückstände einer jeweiligen Blindprobe ohne zugegebene Fäzesproben bezogen und werden daher als prozentualer Anteil an nicht fermentierten Polysacchariden angegeben. Alle dargestellten Werte wurden um die Werte der gravimetrischen Bestimmung von humanen Fäzesproben ohne zugegebene Pektine korrigiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten. Die Zahlenwerte der gravimetrischen Bestimmung (in mg) und die zugehörigen Standardabweichungen sind in Tabelle B 11 im Anhang gezeigt. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP.L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

Zwischen den Fermentationszeitpunkten 10 min und 4 h ist für alle Pektine die größte Abnahme an nicht fermentierten Polysacchariden zu erkennen. Nach 4 h Fermentationszeit sind mit 18,3 - 21,2 % die höchsten Restpolysaccharidgehalte für CP1, AP2 und SBP im Vergleich zu den anderen untersuchten Pektinen nachweisbar, was auf eine langsamer fortschreitende Fermentation dieser Pektine hindeutet. Die labortechnisch extrahierten Pektine CP.L1 und AP.L zeigen dahingegen Restpolysaccharidgehalte von 2,9 % und 5,4 % und damit die geringsten Werte. Dabei ist

4. Ergebnisse und Diskussion

allerdings zu beachten, dass für CP2 in diesem Ansatz bereits nach 4 h Fermentationszeit keine Polysaccharide mehr gravimetrisch bestimmbar waren, während im ersten Ansatz noch 11,9 % der Ausgangspolysaccharide nachweisbar waren. Dies deutet auf einen in diesem Fermentationszeitraum schneller fortschreitenden Abbau der Polysaccharide im zweiten Fermentationsansatz, in welchem die labortechnisch hergestellten Pektine untersucht wurden, hin. Auch zeigt dies die Veränderlichkeit der Mikrobiota in zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommenen Stuhlproben und dass die Unterschiede in der Quantität und Zusammensetzung der Bakterien die Fermentation der Pektine stark beeinflussen kann. Nach Fermentationszeiten von 24 und 48 h waren für alle Pektine unabhängig vom Fermentationsansatz keine Polysaccharide mehr gravimetrisch bestimmbar. So kann für alle in dieser Arbeit untersuchten, strukturell unterschiedlichen Pektine auf eine weitgehend vollständige Depolymerisierung der Pektine nach einer Fermentationszeit von 24 h geschlossen werden.

Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit vorherigen Studien, bei denen Apfel- und Citruspektine in *in vitro* Fermentationsansätzen mit humanen Fäzesbakterien umgesetzt wurden. Dabei waren nach einer Fermentationszeit von maximal 8 h bei allen untersuchten Pektinen keine Uronsäuren mehr in den Fermentationsansätzen nachweisbar (Gulfi *et al.* 2005; Lu *et al.* 2022). Durch die nicht erfolgte Separierung von Oligo- und Polysacchariden wurden bei der Galacturonsäurebestimmung allerdings auch ethanollösliche Strukturen und somit oligomere Verbindungen nach bakterieller Depolymerisierung erfasst. Da mit der gravimetrischen Bestimmung lediglich die unfermentierten Polysaccharide der Pektine erfasst werden, sind die Daten nicht direkt vergleichbar.

4.4.1.2. Veränderungen in der Molekulargewichtsverteilung

Um weitere Rückschlüsse auf den Fortschritt der Pektinfermentation zu erhalten, wurden die Molekulargewichtsverteilungen der nicht fermentierten Polysaccharide nach *in vitro* Fermentation der kommerziellen (A) und labortechnisch hergestellten (B) Pektine betrachtet (Abbildung 21).

Bei allen Pektinen war bereits nach einer kurzen Fermentationszeit (Zeitpunkt: 10 min) eine deutliche Verschiebung der Verteilungen hin zu geringeren Molekulargewichten zu beobachten. Dies bestätigt den schnell einsetzenden Abbau der Pektine, welcher bereits bei der gravimetrischen Bestimmung der nicht fermentierten Polysaccharide zu sehen war. Bei einem Vergleich der Molekulargewichtsverteilungen von CP2 in den Fermentationsansätzen A und B sind zu diesem Zeitpunkt lediglich geringe Unterschiede auszumachen, was einen Vergleich der beiden Fermentationsansätze ermöglicht. Nach 10-minütiger Fermentationszeit sind bei SBP und AP.L breitere Molekulargewichtsverteilungen erkennbar als bei den restlichen Pektinen. Gekennzeichnet sind diese insbesondere durch Signale im höhermolekularen Bereich (charakterisiert durch Elutionsvolumina zwischen 5,5 und 7,5 mL).

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

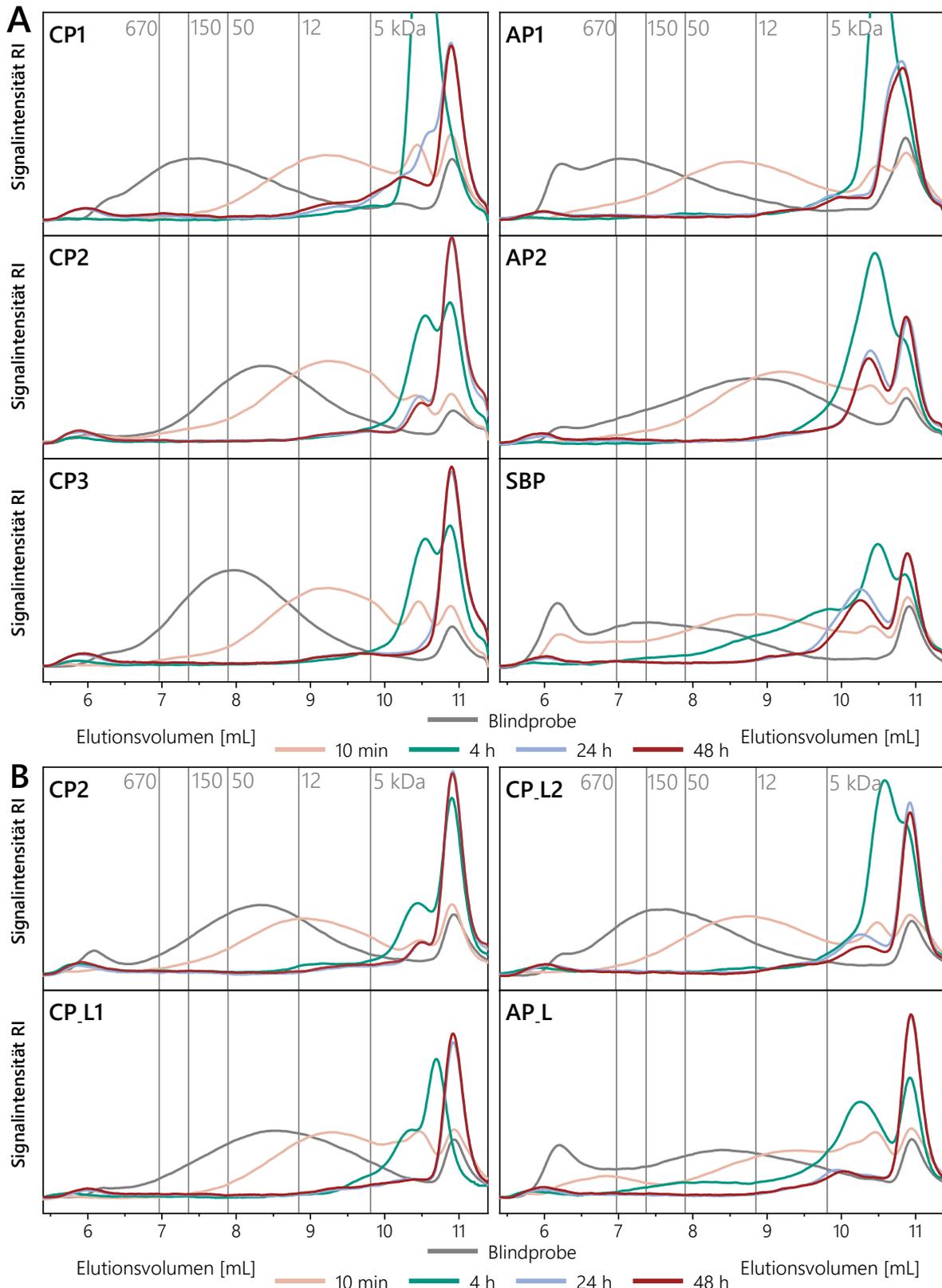


Abbildung 21: Chromatogramme der unfermentierten, natriumnitratlöslichen Pektinpolysaccharide nach *in vitro* Fermentation mit humanen Fäzesproben der sechs kommerziellen Pektine (A) und der drei labortechnisch hergestellten Pektine (B) über verschiedene Zeiten. Eine Blindprobe ohne zugegebene Fäzes zeigt die ursprüngliche Verteilung vor *in vitro* Fermentation an. Die Molekulargewichtsverteilung wurde mittels Größenausschlusschromatographie (HPSEC) mit Brechungsindexdetektor (RI) analysiert. Um die Vergleichbarkeit der zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Fermentationsansätze (A bzw. B) abzuschätzen, wurde bei Ansatz B ein industrielles Pektin (CP2) erneut mitgeführt. Dextranstandardsubstanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten (5 - 670 kDa) wurden als Referenzsubstanzen verwendet (vertikale Linien). AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP.L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

4. Ergebnisse und Diskussion

Zwischen 10 min und 4 h Fermentationszeit ist bei allen untersuchten Pektinen die größte Verschiebung in der Molekulargewichtsverteilung zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass ein Großteil des Abbaus der Pektinpolysaccharide innerhalb dieses Zeitraums abläuft, was ebenfalls die Daten zur gravimetrischen Bestimmung der nicht fermentierten Polysaccharide bestätigt. Bei einem Vergleich der *in vitro* Fermentationsansätze A und B sind bei den Molekulargewichtsverteilungen von CP2 nach 4 h Fermentationszeit geringe Unterschiede auszumachen. So weist einerseits das Signal bei einem Elutionsvolumen von etwa 11 mL bei Ansatz B eine höhere Signalintensität auf, was auf eine zumindest partiell schnellere Umsetzung der Pektine in niedermolekulare Strukturen schließen lässt. Andererseits ist bei einem Elutionsvolumen von etwa 9 mL ein Signal auszumachen, welches in Ansatz A nicht detektiert wurde. Dieses deutet auf eine langsamere Fermentation einzelner Strukturen mit moderatem Molekulargewicht hin. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtungen ist ein Vergleich der Ergebnisse aller Pektine zu diesem Zeitpunkt möglich.

Dabei ist auch nach einer Fermentationszeit von 4 h für SBP und AP-L eine breitere Verteilung des Molekulargewichts zu beobachten, was wiederum auf eine langsamere Fermentation von höhermolekularen Strukturen der beiden Pektine bis zu diesem Zeitpunkt schließen lässt. Als eine strukturelle Besonderheit von SBP und AP-L ist der hohe DAC im Vergleich zu den anderen untersuchten Pektinen zu nennen (vgl. Kapitel 4.2.). In bisherigen Studien konnte ein höherer DAC allerdings nicht mit einem verlangsamten Fermentationsprozess von Pektinen in Verbindung gebracht werden. Jedoch wurde in einer Studie von Gómez und Mitarbeitenden eine langsamere Umsetzung von Oligosacchariden aus Zuckerrübenpektinen im Vergleich zu Oligosacchariden aus Citruspektinen mit humanen Fäzes festgestellt. So wurde nach 10-stündiger *in vitro* Fermentation der Proben eine Abnahme der Konzentration an oligomeren Galacturonsäurestruktureinheiten von 83 % für Citruspektine und von 49 % für Zuckerrübenpektine beobachtet. Als struktureller Unterschied der beiden Ausgangsmaterialien ist in dieser Studie insbesondere der hohe DAC der Zuckerrübenpektine auszumachen (Gómez *et al.* 2016). So stellt ein hoher DAC eine mögliche Ursache für eine langsamere Fermentation von Pektinen dar.

Daneben zeichnet sich SBP als einziges der untersuchten Pektine durch einen vergleichsweise hohen Anteil an seitenkettenhaltigen Typ II (Arabino-)Galactanen aus. Aus Lauch isoliert, wurden in einer Studie von Gulfi und Mitarbeitenden Typ II (Arabino-)Galactane als Standardsubstanz in einem *in vitro* Fermentationsansatz eingesetzt und mit dem Fermentationsverhalten von *Hairy Regions* aus Apfelpektinen verglichen. Diese setzten sich im Gegensatz zu den Typ II (Arabino-)Galactanen bei einem Arabinoseanteil von etwa 70 mol% überwiegend aus hochverzweigten Arabinanstrukturen mit einem sehr geringen Anteil an galactosehaltigen neutralen Seitenketten zusammen. Die Umsetzung der Typ II (Arabino-)Galactane erfolgte unter den Bedingungen des *in vitro* Fermentationsansatzes deutlich langsamer, sodass nach einer Fermentationszeit von 24 h noch 20 % des entsprechenden Ausgangsmaterials nachweisbar

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

waren. Gleichzeitig konnte für die *Hairy Regions* aus Apfelpektinen ein vollständiger Abbau nach einer Fermentationszeit von 6 h gezeigt werden. Als mögliche Ursache für die langsamere Metabolisierung wurde in dieser Studie die helicale Struktur des Rückgrats der Typ II (Arabino-)Galactane aus Lauch genannt, welche durch arabinose- und galactosehaltige Seitenketten möglicherweise vor äußeren Einflüssen wie auch vor mikrobiellem Abbau geschützt wird (Gulfi *et al.* 2007; Chandrasekaran und Janaswamy 2002). Diese strukturelle Anordnung wurde bereits unter Berücksichtigung der potentiellen Energien der beteiligten Struktureinheiten als energetisch sinnvolle Konformation der Typ II (Arabino-)Galactane postuliert (Pérez *et al.* 2000). So ist das Auftreten verzweigter Typ II (Arabino-)Galactanstruktureinheiten eine weitere mögliche Erklärung für die langsamere Metabolisierung von SBP im *in vitro* Fermentationsansatz im Vergleich zu den anderen untersuchten Pektinen.

Bei den restlichen untersuchten Pektinen liegen die Signale der Molekulargewichtsverteilungen nach einer Fermentationszeit von 4 h überwiegend in einem Elutionsbereich von 9,5 - 11,3 mL. So kann bei diesen Pektinen von einem umfangreichen Abbau der Polysaccharide innerhalb der 4-stündigen *in vitro* Fermentation ausgegangen werden. Nach einer Fermentationszeit von 24 h ist eine weitere Verschiebung der Verteilung zu geringeren Molekulargewichten für alle Pektine zu beobachten. Zusätzlich sind die Kohlenhydratstrukturen von CP2 nach beiden Fermentationsansätzen durch nahezu kongruente Molekulargewichtsverteilungen gekennzeichnet, was auf eine Angleichung der beiden *in vitro* Fermentationsansätze und auf die Bildung von Fermentationsprodukten mit ähnlichen Molekulargewichtsverteilungen nach einer 24-stündigen Fermentationszeit hindeutet. Insgesamt zeigen die meisten Chromatogramme der untersuchten Pektine zu diesem Zeitpunkt ein Hauptsignal bei einem Elutionsvolumen von etwa 11 mL. AP2 und SBP weisen dahingegen ein intensives Signal zwischen 9,5 - 10,5 mL auf. Dies kann vermutlich auf Unterschiede in der Feinstruktur der Pektine zurückgeführt werden, wodurch die Zugänglichkeit der Pektine beeinflusst werden kann. Dabei kann unter anderem die Verteilung der Methylgruppen in den Homogalacturonanen sowie die Länge und die Verteilung der Abschnitte der Homogalacturonane und des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane eine Rolle spielen. Nach 48-stündiger Fermentation sind oft nur geringfügige Unterschiede in den Molekulargewichtsverteilungen der verschiedenen Pektine zum vorherigen Fermentationszeitpunkt auszumachen. Dies unterstützt die Ergebnisse der gravimetrischen Bestimmung der ethanolunlöslichen Polysaccharide, welche den Abbau der polymeren Pektinstrukturen nach 24-stündiger *in vitro* Fermentation als nahezu vollständig identifizierten. Lediglich bei CP1, SBP und AP-L sind im Vergleich zu den anderen Pektinen größere Unterschiede zwischen den zwei Fermentationszeitpunkten zu sehen. Diese Pektine enthalten daher vermutlich Strukturen, welche enzymatisch schlechter zugänglich sind.

Zu erwähnen ist, dass bei allen untersuchten Pektinen nach einer *in vitro* Fermentationszeit von 24 und 48 h Signale im höhermolekularen Bereich eines Elutionsvolumens von 5,5 - 6,5 mL zu

4. Ergebnisse und Diskussion

sehen sind. Im Fermentationszeitraum von 10 min bis 4 h sind die Signalintensitäten in diesem Elutionsbereich gering und nehmen mit fortschreitender Fermentationszeit an Intensität zu. Dies deutet auf die Solubilisierung zuvor natriumnitratunlöslicher Strukturen hin, welche durch den fermentationsbedingten Abbau solubilisierbar und so bei der Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung miterfasst werden. Zwischen 24- und 48-stündiger Fermentationszeit sind in diesem Elutionsbereich nahezu keine Veränderungen in den Molekulargewichtsverteilungen aller Pektine zu beobachten. Dies lässt für alle untersuchten Pektine auf die Freisetzung hochmolekularer, fermentationsresistenter Strukturen im Zuge der *in vitro* Fermentation schließen. Auch in einer Studie von Rösch und Mitarbeitenden waren nach der *in vitro* Fermentation eines Zuckerrübenpektins über 48 h weiterhin polymere Pektinstruktureinheiten mittels HPSEC-RI nachweisbar. Dabei waren zwischen den Elutionsprofilen nach 24 und 48 h Fermentationszeit ebenfalls nur geringe Unterschiede auszumachen, was auf eine nahezu vollständige Umsetzung der zugänglichen Strukturen des Pektins nach 24 h hindeutet (Rösch *et al.* 2017).

4.4.1.3. Veränderungen in der Feinstruktur

Die Monosaccharidzusammensetzungen der nicht fermentierten Polysaccharide nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse sind in Abbildung 22 dargestellt. Um fermentationsbedingte Veränderungen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu visualisieren, wurde für jedes der untersuchten Pektine zusätzlich die Monosaccharidzusammensetzung der nicht fermentierten Polysaccharide der entsprechenden Blindproben ohne Zugabe von humanen Fäzesproben gezeigt. Um die Vergleichbarkeit der beiden *in vitro* Fermentationsansätze einzuordnen, wurden wiederum die Proben von CP2 nach beiden Fermentationsansätzen analysiert.

Nach einer kurzen Fermentationszeit von 10 min sind bereits erste Veränderungen in den Monosaccharidverteilungen aller Pektine im Vergleich zu den Ausgangspektinen zu sehen. Diese zeigen bei fast allen untersuchten Pektinen einen Rückgang des molaren Anteils an Arabinose und Galactose an, was auf eine schnell beginnende Metabolisierung der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane hindeutet. Insbesondere bei CP3 sowie CP.L1, CP.L2 und AP.L war dieser Rückgang mit einer prozentualen Abnahme des molaren Anteils an Arabinose und Galactose zwischen 70 - 80 % stark ausgeprägt. Mit 15 - 45 % war bei den anderen Pektinen ein deutlich geringerer Rückgang dieser Anteile zu beobachten, was möglicherweise auf unterschiedliche Zugänglichkeiten der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane zurückzuführen ist. Bei der Einschätzung der prozentualen Veränderungen ist allerdings zu beachten, dass die labortechnisch extrahierten Pektine über einen höheren initialen Anteil an neutralen Seitenketten verfügen und so die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Umsetzung erhöht wird. Im Gegensatz dazu konnte nur für CP2 kein Rückgang des Anteils an neutralen Seitenketten in beiden *in vitro* Fermentationsansätzen beobachtet werden.

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

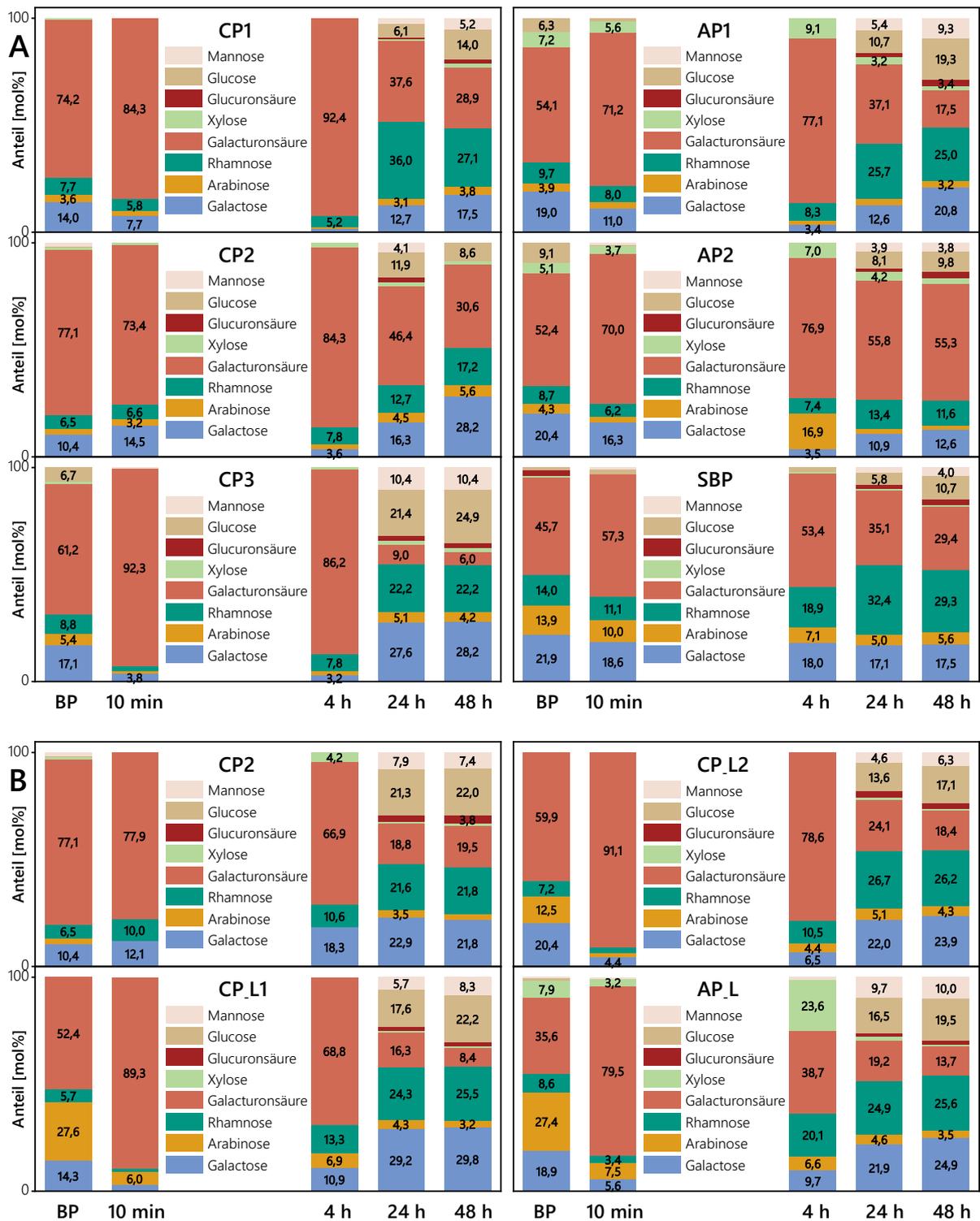


Abbildung 22: Monosaccharidzusammensetzungen der nicht fermentierten Polysaccharide (mol%, n=3) nach *in vitro* Fermentation mit humanen Fäzesproben der sechs industriellen Pektine (A) und der drei labortechnischen Pektine (B) über verschiedene Zeiten und je einer Blindprobe (BP) ohne zugegebene Fäzes. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA)-Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Um die Vergleichbarkeit der Proben abzuschätzen, wurde bei Ansatz B ein industrielles Pektin (CP2) erneut mitgeführt. Die Zahlenwerte inklusive Standardabweichung sind in Tabelle B 12 im Anhang gezeigt. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP-L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP-L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

4. Ergebnisse und Diskussion

Bei einer Betrachtung der glykosidischen Bindungen in den nicht fermentierten Polysacchariden der kommerziellen Pektine nach 10-minütiger Fermentation sind in den Arabinanstrukturen fast aller Pektine keine 1,2,5- und 1,3,5-Arabinofuranoseeinheiten mehr nachweisbar (vgl. Tabelle B 14 und Tabelle B 15 im Anhang). Dies deutet auf einen bevorzugten Abbau der verzweigten Arabinanstruktureinheiten zu Beginn des *in vitro* Fermentationsprozesses hin. Dabei ist bei AP1 und CP3 nach 10-minütiger Fermentation ein ähnlicher Anteil an terminaler und 1,5-verknüpfter Arabinofuranose im Vergleich zu den Ausgangspektinen nachweisbar, was für einen weitgehenden Erhalt dieser Struktureinheiten in den Polysacchariden spricht. Bei CP2 und AP2 nimmt der Anteil an terminaler Arabinose bezogen auf die gesamten arabinosebasierten PMAA in den Pektinen zu, während der Anteil an 1,5-verknüpften Arabinoseeinheiten rückläufig ist. So kann auf einen beginnenden Abbau des linearen Rückgrats der Arabinane in diesen Pektinen geschlossen werden. SBP stellt bei der Betrachtung der arabinosebasierten PMAA eine Ausnahme dar, da die Anteile an verzweigten Arabinofuranoseeinheiten lediglich geringfügig zurückgehen. Zusätzlich ist eine deutliche Zunahme des Anteils an 1,3-verknüpfter Arabinofuranose zu sehen, was auf einen langsameren Abbau der Seitenketten der Arabinane schließen lässt. Bei Betrachtung der galactosebasierten PMAA ist bei allen untersuchten Pektinen insbesondere ein Rückgang im Anteil der 1,4-verknüpften Galactopyranoseeinheiten zu sehen, was eine Verkürzung der Kettenlängen der Typ I (Arabino-)Galactane reflektiert. Aus dem Verhältnis von 1,2,4- zu 1,2-Rhamnopyranoseeinheiten geht außerdem für alle Pektine außer SBP eine Abnahme des Substitutionsgrades des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane hervor. Entsprechend kann bei diesen Pektinen auch eine Spaltung der Bindungen zwischen den neutralen Seitenketten und den Rhamnoseeinheiten der Typ I Rhamnogalacturonane vermutet werden.

Nach einer Fermentationszeit von 4 h ist in Ansatz A der kommerziellen Pektine eine weitere Abnahme des Anteils an Galactose und Arabinose im Vergleich zur 10-minütigen Fermentation zu beobachten, was auf einen weiteren Abbau der neutralen Seitenketten hindeutet. Durch die Verhältnisse der bestimmaren galactosebasierten PMAA in den nicht fermentierten Polysacchariden kann bei SBP lediglich ein geringfügiger Rückgang des Anteils an 1,3-verknüpfter Galactopyranose ausgemacht werden, während der Anteil an 1,6-verknüpften Galactoseeinheiten nach einer Fermentationszeit von 4 h nicht weiter bestimmbar war. Dies deutet auf eine umfassende Metabolisierung der Seitenketten der Typ II (Arabino-)Galactane zwischen 0 und 4 h Fermentationszeit hin, während das Rückgrat aus 1,3-verknüpfter Galactose weitgehend intakt bleibt. So kann die Beobachtung einer langsameren Umsetzung von Typ II (Arabino-)Galactanen im Gegensatz zu anderen Pektinstruktureinheiten von Gulfi und Mitarbeitenden (2007) zumindest teilweise bestätigt werden. Bei Betrachtung der Strukturen der Typ I (Arabino-)Galactane ist über das Verhältnis von terminalen- zu 1,4-verknüpften Galactopyranoseeinheiten eine weitere Verringerung der Kettenlänge bei allen Pektinen zu beobachten. Im Gegensatz dazu kann bei Betrachtung der PMAA von terminaler und 1,5-verknüpfter Arabinofuranose pektinübergreifend

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

eine Zunahme der durchschnittlichen Kettenlänge der Arabinane ausgemacht werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist ein bevorzugter vollständiger Abbau kürzerer Arabinseitenketten. Dafür spricht auch der weiter rückläufige Substitutionsgrad der Rhamnoseeinheiten der Typ I Rhamnogalacturonane.

Die Anteile an Galacturonsäure in den nicht fermentierten Polysacchariden liegen für alle in Ansatz A metabolisierten Pektine nach einer Fermentationszeit von 4 h in einem ähnlichen Bereich wie zum vorherigen Zeitpunkt. So kann ein extensiver Abbau von Homogalacturonanstruktureinheiten und, zusammen mit einem gleichbleibenden oder zunehmenden Anteil an Rhamnose, von Strukturen des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane ausgeschlossen werden. Beim Fermentationsansatz B ist nach einer Fermentationszeit von 4 h bei allen Pektinen ein Rückgang des Anteils an Galacturonsäure zu sehen, welcher bei AP.L mit einer Abnahme auf 38,7 mol% besonders ausgeprägt ist. Dies deutet auf eine schnellere Umsetzung der Strukturen der Homogalacturonane in diesem Fermentationsansatz hin. Aufgrund des zeitlichen Abstands der *in vitro* Fermentationsansätze ist diese Beobachtung vermutlich auf eine abweichende Zusammensetzung der humanen Fäzesproben und der darin enthaltenen bakteriellen CAZymes zurückzuführen.

Nach einer Fermentationszeit von 24 h ist bei beiden Fermentationsansätzen ein (weiterer) Rückgang der Anteile an Galacturonsäure in den nicht fermentierten Polysacchariden aller untersuchten Pektine zu beobachten. Die prozentuale Abnahme dieses Anteils zwischen 4- und 24-stündiger Fermentation ist zwischen den Pektinen mit etwa 30 - 90 % unterschiedlich ausgeprägt. So weisen CP2 und AP2 in Ansatz A mit 46,4 mol% bzw. 55,8 mol% einen höheren Galacturonsäureanteil auf als die restlichen untersuchten Pektine. Bei CP3 ist mit 9,0 mol% der geringste Anteil an Galacturonsäure nachzuweisen, was auf eine bessere Zugänglichkeit der galacturonsäurehaltigen Strukturen von CP3 für die in den Fäzesproben enthaltenen bakteriellen Enzyme hindeutet. Bei einem Vergleich der beiden *in vitro* Fermentationen von CP2 kann bei Ansatz B ein deutlich geringerer Anteil an Galacturonsäure nachgewiesen werden. So kann wiederum auf eine gesamtheitlich schnellere Umsetzung der Homogalacturonanstruktureinheiten in Ansatz B geschlossen werden. Die Betrachtung der nach 24-stündiger Fermentation nicht umgesetzten Pektinpolysaccharide in Ansatz B zeigt Galacturonsäureanteile von 16,3 - 24,1 mol% und somit in einem ähnlichen Bereich. Zusätzlich ist bei allen untersuchten Apfelpektinen ein Rückgang des Xyloseanteils zu beobachten, was vermutlich auf einen Abbau von Xylogalacturonanstruktureinheiten zurückgeführt werden kann. Die zunehmenden Anteile an Galactose und Arabinose nach 24-stündiger Fermentationszeit deuten auf eine nicht weiter fortschreitende Umsetzung der entsprechenden Strukturelemente hin. So kann von einer nahezu vollständigen Metabolisierung der enzymatisch zugänglichen Arabinan- und (Arabino-)Galactanstruktureinheiten nach einer Fermentationszeit von 4 h ausgegangen werden. Die Verlängerung der Pektinfermentation auf 48 h resultiert für AP2, CP3 und SBP in Ansatz A sowie für alle in

4. Ergebnisse und Diskussion

Ansatz B umgesetzten Pektine nur in geringfügigen Veränderungen in den Monosaccharidzusammensetzungen der nicht fermentierten Polysaccharide. Dies deutet wiederum auf eine nahezu vollständige Metabolisierung der zugänglichen polymeren Pektine nach einer Fermentationszeit von 24 h hin, was die Daten der gravimetrischen Bestimmung sowie der Molekulargewichtsverteilung der nicht fermentierten Polysaccharide bestätigt. Abweichend ist bei CP2 im Fermentationsansatz A ein weiterer Rückgang des Anteils an Galacturonsäure zu beobachten, während bei CP1 und AP1 zusätzlich der Anteil an Rhamnose abnimmt. Entsprechend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass bei letzteren auch zu diesen Fermentationszeitpunkten noch ein Abbau des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane erfolgt.

Zusätzlich zu den für Pektine charakteristischen Monosacchariden sind nach Fermentationszeiten von 24 und 48 h zunehmend Anteile an Mannose und Glucose sowie Glucuronsäure und Xylose nachzuweisen. Dabei sind die Mannoseeinheiten vermutlich zumindest teilweise auf den im Fermentationsmedium enthaltenen Hefeextrakt zurückzuführen, da polymere Mannosestrukturen ein Hauptbestandteil von Hefezellwänden darstellen (Cabib *et al.* 1982). Über die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide im Medium ohne zugegebene Pektin- und Fäzesproben konnte nach allen Inkubationszeiten mit etwa 60 - 70 mol% ein hoher Anteil an Mannose an diesen Polymeren bestätigt werden (vgl. Tabelle B 13 im Anhang). Bei Betrachtung der Kontrollprobe aus Medium und humanen Fäzesproben ohne zugegebene Pektine ist mit zunehmender Fermentationszeit eine Abnahme der Mannoseanteile zu beobachten, was auf eine Umsetzung der Hefezellen durch die bakteriellen Enzyme hindeutet (vgl. Tabelle B 13 im Anhang). Gleichzeitig ist insbesondere eine Zunahme des Anteils an Glucose, Galactose und Rhamnose zu sehen. Für nicht kolonale gramnegative Bakterien konnten diese Monosaccharide bereits als Bestandteil der bakteriellen Zellwand nachgewiesen werden (Ushijima *et al.* 1971; Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014). Dies lässt auch hier vermuten, dass diese Monosaccharide zumindest teilweise aus den Polymeren der Zellwände der in den Fäzes enthaltenen Bakterien stammen. So können insbesondere nach einer Fermentationszeit von 24 und 48 h die Anteile an Galactose und Rhamnose nicht ausschließlich ethanolunlöslichen Pektinstruktureinheiten zugeordnet werden. Dennoch sind in allen nicht fermentierten Polysacchariden nach einer Fermentationszeit von 48 h weiterhin für Pektine charakteristische Monosaccharide nachweisbar, welche vermutlich nicht (ausschließlich) den bakteriellen Zellwänden zugeordnet werden können. So weisen alle untersuchten Pektine in den beiden *in vitro* Fermentationsansätzen unter diesen Bedingungen fermentationsresistente Struktureinheiten auf.

Die hier dargestellten Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer Studie von Rösch und Mitarbeitenden, in welcher die Gehalte an löslichen Arabinan- und (Arabino-)Galactanoligo- und polysacchariden von Zuckerrübenpektinen innerhalb der ersten 4 bis 12 h der *in vitro* Fermentation stark abgenommen haben. Der Rückgang galacturonsäurehaltiger Strukturen wurde dahingegen erst in einem Zeitraum von 12 bis 24 h beobachtet. Zusätzlich konnten auch

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

nach einer Fermentationszeit von 48 h weiterhin arabinose-, galactose- und galacturonsäurehaltige Strukturen nachgewiesen werden (Rösch *et al.* 2017).

4.4.2. Identifizierung von mono-, di- und oligomeren Spaltprodukten

Um eine Analyse der mono-, di- und oligomeren Spaltprodukte der untersuchten Pektine nach *in vitro* Fermentation über unterschiedliche Zeiten (10 min, 4 h, 24 h und 48 h) zu ermöglichen, wurden diese durch Einstellen einer Ethanolkonzentration von 80 % von den polymeren Pektinen abgetrennt. Die ethanollösliche Fraktion wurde nach dem Austausch des Lösungsmittels über verschiedene, primär HPLC-MS-basierte Verfahren charakterisiert, welche in Kapitel 3.6.2. näher beschrieben sind.

Die in Abbildung 23 dargestellten HPAEC-PAD-basierten Chromatogramme der mono-, di- und oligomeren Spaltprodukte der untersuchten Pektine sind unterteilt in *in vitro* Fermentationsansatz A (kommerzielle Pektine) und B (labortechnisch hergestellte Pektine). Um die Vergleichbarkeit der beiden Ansätze abzuschätzen, wurde bei der Analyse wiederum CP2 als Vergleichspektin in Ansatz B mitgeführt. Zusätzlich wurden die Kontrollproben mit lediglich Medium, Medium und humanen Fäzesproben (ohne Pektine) sowie Medium und die entsprechenden Pektine ohne Fäzesproben (Blindproben) mittels HPAEC-PAD/MS untersucht. So konnte die Bildung der identifizierten Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide auf den *in vitro* Fermentationsprozess eingegrenzt werden und ausgeschlossen werden, dass die Strukturen bereits in den ursprünglichen Komponenten des Ansatzes enthalten waren. Die Chromatogramme der Blind- und Kontrollproben sind in Abbildung B 8 und Abbildung B 9 im Anhang dargestellt.

Unter Berücksichtigung der Chromatogramme der Kontrollproben konnten bereits nach einer 10-minütigen Fermentationszeit bei allen Pektinproben neu gebildete Signale mit kohlenhydratspezifischen m/z nachgewiesen werden. Dabei konnte über die m/z von 349, 511, 673 und 835 auf Oligomere aus Hexosen mit einem DP von 2 - 5 geschlossen werden. Diese konnten im Fermentationsansatz A für alle untersuchten Pektine nachgewiesen werden, während in Fermentationsansatz B für keines der untersuchten Pektine das entsprechende Trimer nachweisbar war. Über einen Vergleich der bei dieser Analyse ermittelten Retentionszeiten mit den Retentionszeiten der erhaltenen Oligosaccharide nach enzymatischer Umsetzung der Pektinstandardsubstanzen und der kommerziellen Pektine (vgl. Kapitel 4.3.) war es möglich, die gebildeten Strukturen als galactosehaltige Oligosaccharide zu charakterisieren. Um dies zu bestätigen, wurden die den Signalen entsprechenden Verbindungen über eine Kopplung aus HPAEC-basierter, analytischer Auftrennung mit einer automatisierten Fraktionierung semipräparativ isoliert (vgl. Kapitel 3.6.3. und Abbildung B 10 im Anhang) und hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzungen analysiert. Dabei wurde für alle untersuchten Hexoseoligomere ein Anteil von 73 - 92 mol% an Galactose nachgewiesen (vgl. Tabelle B 16 im Anhang). Die neben der Galactose nachweisbaren Monosaccharide sind aufgrund des komplexen

4. Ergebnisse und Diskussion

Chromatogramms und einer geringen Retentionszeitverschiebung während der Fraktionierung vermutlich auf die Co-Elution mit weiteren Mono- und/oder Oligosacchariden zurückzuführen. Dies konnte über die Reinjektion der präparativ isolierten Fraktionen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). So war eine eindeutige Zuordnung der bereits nach 10-minütiger Fermentation auftretenden Spaltprodukte als Galactoseoligosaccharide mit einem DP von 2 - 5 möglich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die galactosehaltigen neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane aller untersuchten Pektine bereits innerhalb von 10 min teilweise metabolisiert werden. Zusammen mit der deutlichen Abnahme des molaren Anteils an Galactose in den Monosaccharidzusammensetzungen der nicht fermentierten Polysaccharide (vgl. Abbildung 22) deuten die weniger intensiven Signale der Galactooligosaccharide in den Chromatogrammen der labortechnischen Pektine sowie CP2 auf eine schnellere Umsetzung der galactosehaltigen Seitenketten in Ansatz B im Vergleich zu jenen in Ansatz A hin. Durch einen Vergleich der Chromatogramme von CP2 in beiden Ansätzen kann dies zumindest teilweise auf eine abweichende Zusammensetzung der Mikrobiota der eingesetzten Mischfäzessuspension und damit der bakteriellen CAZymes zurückgeführt werden.

Zusätzlich zu den galactosehaltigen Oligosacchariden war es über einen Vergleich zu den enzymatisch behandelten Pektinen möglich, den Signalen mit einer Retentionszeit von 75,8 min und 79,4 min die Di- und Trimere der Galacturonsäure zuzuordnen. Dies konnte wiederum über die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der präparativ isolierten Verbindungen bestätigt werden (vgl. Tabelle B 16 im Anhang). Da es sich bei den beiden identifizierten Strukturen um reine Galacturonsäureoligosaccharide handelt, können diese als intermediäre Spaltprodukte eindeutig den Homogalacturonanen zugeordnet werden. Dies impliziert, dass bereits innerhalb einer 10-minütigen Fermentationszeit die Metabolisierung der Homogalacturonane beginnt. In Fermentationsansatz B sind die Signalintensitäten dieser Verbindungen wiederum deutlich geringer als in Ansatz A. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich auf eine zu diesem Zeitpunkt weniger stark fortgeschrittene Metabolisierung der galacturonsäurehaltigen Strukturen in Ansatz B zurückführen.

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

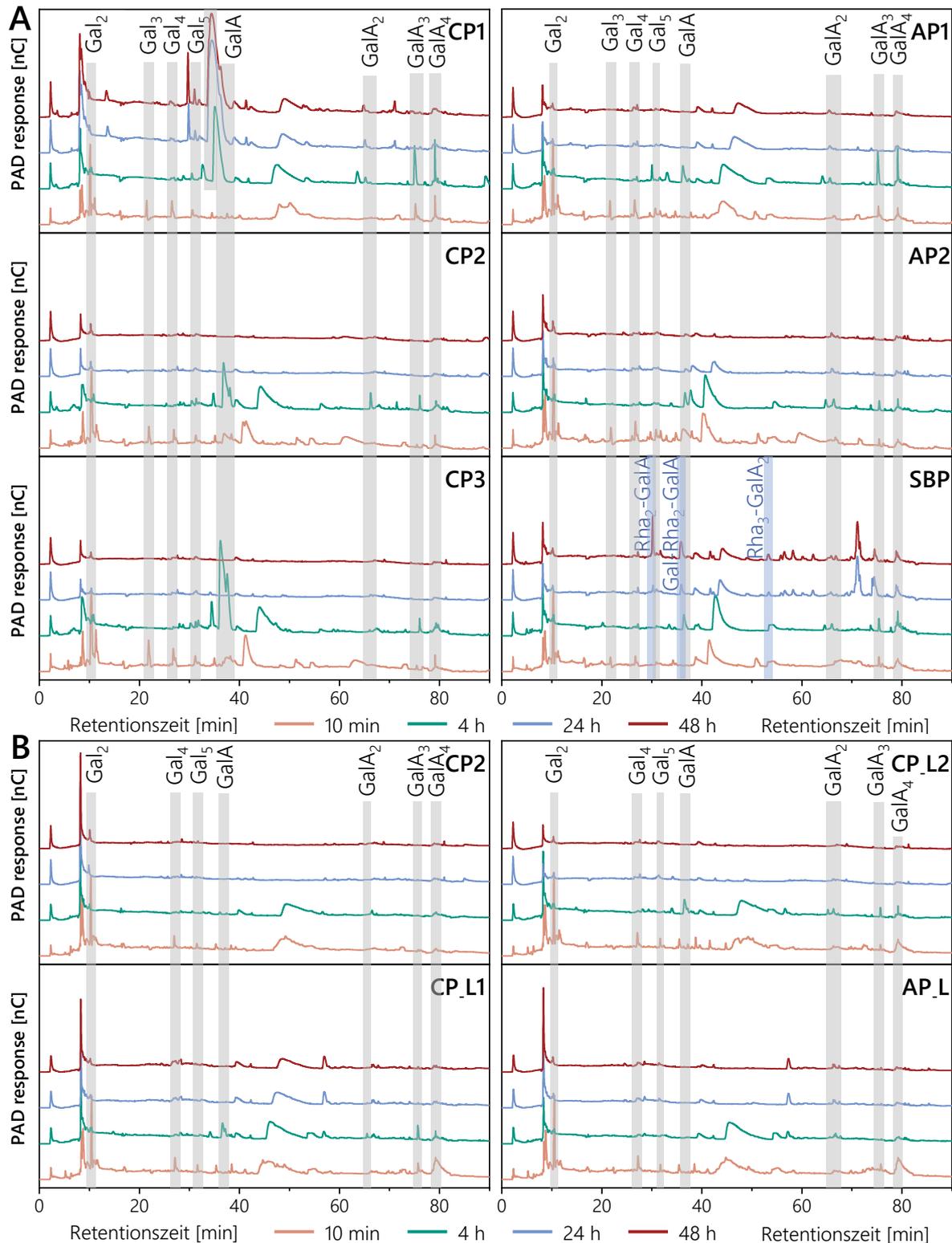


Abbildung 23: Chromatogramme der sechs kommerziellen Pektine (A) und der drei labortechnisch hergestellten Pektine (B) nach *in vitro* Fermentation über verschiedene Zeiten. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigten Mono-, Di- und Oligosaccharide (gekennzeichnet durch graue Balken) wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Zusätzlich wurden die präparativ isoliert und bezüglich ihrer Monosaccharidzusammensetzung analysiert (Tabelle B 16 im Anhang). Für die in blau dargestellten Oligosaccharide des kommerziellen Zuckerrübenpektins (SBP) wurde eine weiterführende *Collision-Induced Dissociation* (CID) Fragmentierung mit einer CID-Spannung von 100 eV durchgeführt und die Strukturen über das resultierende Fragmentierungsmuster bestätigt (Abbildung B 13 im Anhang). AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP.L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, Gal_x: Galactose(-oligosaccharid), GalA_x: Galacturonsäure(-oligosaccharid), Rha_x: Rhamnose(-oligosaccharid)

4. Ergebnisse und Diskussion

Da aufgrund des alkalischen pH-Werts bei der Analyse mittels HPAEC die Acetyl- und Methylveresterungen der Pektine abgespalten werden, wurde für die kommerziellen Pektine eine weitere Charakterisierung der ethanollöslichen Struktureinheiten mittels UHPLC-MS² durchgeführt. Dabei war es nach einer 10-minütigen Fermentationszeit möglich, weitere galacturonsäurehaltige Oligosaccharide zu identifizieren. So konnte beispielsweise für SBP über das Fragmentierungsmuster des Signals mit $m/z = 631,45$ ($[M-2H]^{2-}$) ein Heptamer aus Galacturonsäureeinheiten mit einer Methylgruppe nachgewiesen werden (dargestellt in Abbildung 24). Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Fragmentierung von Oligosacchariden sowohl vom reduzierenden als auch vom nicht-reduzierenden Ende ausgehen kann und daher eine eindeutige Zuordnung der Spaltung von glykosidischen Bindungen im Molekül teilweise nicht möglich ist (Zaia 2004). Über die Abspaltung von einer ($m/z = 1087,77$ ($[C_6/Y_6-H]^-$), $m/z = 543,39$ ($[C_6/Y_6-2H]^{2-}$)) sowie von zwei Galacturonsäureeinheiten ($m/z = 911,65$ ($[C_5/Y_5-H]^-$), $m/z = 455,33$ ($[C_5/Y_5-2H]^{2-}$)) konnte die Position der Methylgruppe dennoch auf die Galacturonsäureeinheiten 3, 4 oder 5 ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids eingegrenzt werden. Zusätzlich konnte über eine Ringspaltung der Galacturonsäureeinheit 4 ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende ($m/z = 337,13$ ($[^{0,2}A_4-2H]^{2-}$)) die Galacturonsäure 5 als Träger für die Methylgruppe ausgeschlossen werden. So war eine Eingrenzung der Methylierung auf die Galacturonsäuren 3 oder 4 möglich.

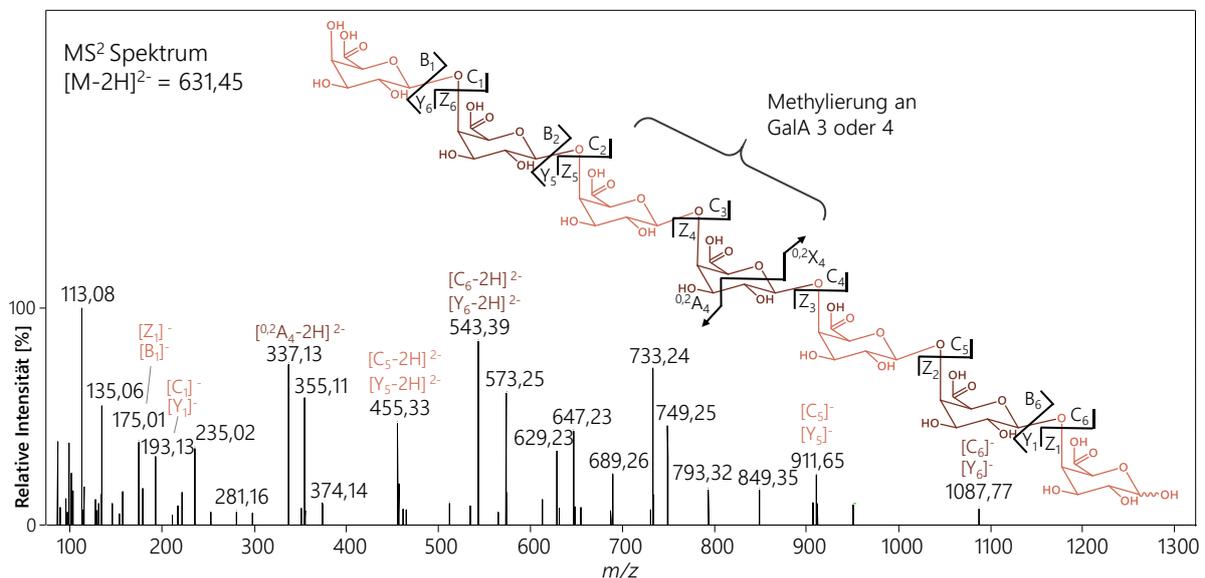


Abbildung 24: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS²) des zweifach negativ geladenen Ions eines Heptamers aus Galacturonsäureeinheiten (GalA) mit einer Methylgruppe an Galacturonsäureeinheit 3 oder 4 ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende ($m/z = 631,45$ ($[M-2H]^{2-}$)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

Eine aus CP1 und CP2 freigesetzte Verbindung mit $m/z = 483,36$ ($[M-2H]^{2-}$) wurde darüber hinaus als Pentamer aus Galacturonsäuren mit zwei Methylierungen und einer Acetylierung identifiziert. Das entsprechende Fragmentierungsmuster ist in Abbildung 25 dargestellt. Aus der Abspaltung zweier unveresterter Galacturonsäureeinheiten resultiert dabei das Fragment mit $m/z = 307,23$ ($[C_4/Y_4-2H]^{2-}$). Da die Abspaltung nicht eindeutig dem reduzierenden oder nicht-reduzierenden

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

Ende des Moleküls zugeordnet werden kann, ist keine eindeutige Aussage über die Lokalisierung der Methyl- und Acetylgruppen möglich. Dieses Fragment zeigt jedoch, dass die Acetylgruppe und beide Methylgruppen in einem Abschnitt von drei benachbarten Galacturonsäureeinheiten im Molekül gebunden sind. Zusätzlich konnte über das Fragment $m/z = 272,19$ ($[C_3/Y_3-2H]^{2-}$) gezeigt werden, dass drei benachbarte Galacturonsäureeinheiten im Molekül unverestert vorliegen. Daher konnte die Lokalisierung der im Molekül vorhandenen Estergruppen auf die benachbarten Galacturonsäureeinheiten 1 und 2 oder 4 und 5 ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids eingegrenzt werden. Das zweifach negativ geladene Fragment mit einem m/z von 191,14 ermöglichte außerdem den Nachweis zweier benachbarter Galacturonsäureeinheiten, von welchen eine Einheit methyliert vorliegt. So konnte gezeigt werden, dass eine der Methylgruppen an der Galacturonsäureeinheit 2 oder 4 ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende gebunden ist, während Galacturonsäureeinheit 1 oder 5 sowohl methyliert als auch acetyliert vorliegt. Die Lokalisierung der Acetylgruppe an Position O-2 oder O-3 der entsprechenden Galacturonsäureeinheit war auf Grundlage dieses MS²-Spektrums nicht möglich.

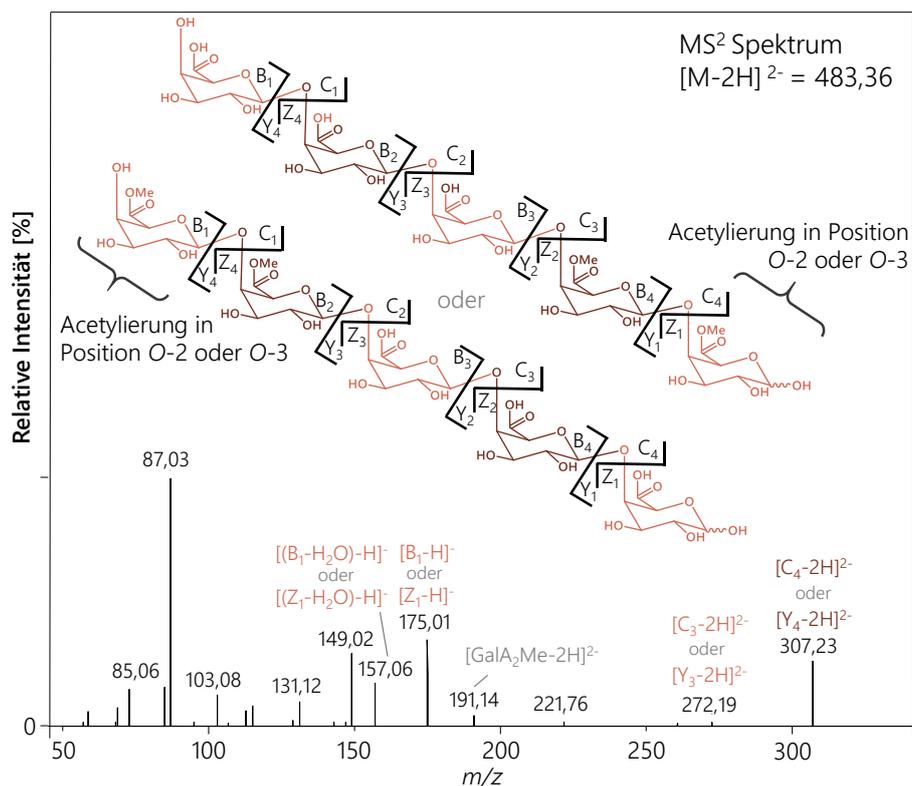


Abbildung 25: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS²) des zweifach negativ geladenen Ions eines Pentamers aus Galacturonsäureeinheiten (GalA) mit zwei Methylgruppen an den Galacturonsäureeinheiten 1 und 2 oder 4 und 5 sowie einer Acetylgruppe an der methylierten Galacturonsäureeinheit 1 oder 5 ($m/z = 483,36$ ($[M-2H]^{2-}$)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

Entsprechend weiterer charakteristischer m/z und Fragmentierungsmusters war es möglich, für alle untersuchten kommerziellen Pektine außer AP2 ein unverestertes Dimer aus Galacturonsäureeinheiten nachzuweisen. Zusätzlich wurde für CP3 das Auftreten des Trimers aus Galacturonsäuren ohne Methylierung und Acetylierung bestätigt. Die entsprechenden MS²-

4. Ergebnisse und Diskussion

Spektren sind in Abbildung B 11 und Abbildung B 12 im Anhang dargestellt. Somit zeigen auch die MS²-Daten, dass der Abbau der Homogalacturonane bereits in den ersten 10 min der *in vitro* Fermentation beginnt.

Nach einer Fermentationszeit von 4 h konnten die nach 10-minütiger Fermentation identifizierten Galactoseoligosaccharide anhand der Daten der HPAEC-PAD/MS-basierten Analyse für keines der untersuchten Pektine weiter nachgewiesen werden (Abbildung 23). So kann von einem schnellen vollständigen Abbau der zugänglichen galactosehaltigen Pektinstruktureinheiten ausgegangen werden. Dagegen war es für alle Pektine des Fermentationsansatzes A nach 4 h Fermentationszeit möglich, Oligomere der Galacturonsäure mit einem DP von 2 - 4 anhand ihrer Retentionszeit zuzuordnen. Das Galacturonsäuremonomer konnte zusätzlich über ein *m/z* von 201 identifiziert werden. Um die Strukturen zu bestätigen, wurde wiederum eine präparative Isolierung der entsprechenden Verbindungen mit anschließender Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzungen durchgeführt. Die isolierten Fraktionen enthielten zu 67 - 100 mol% Galacturonsäure, sodass die genannten galacturonsäurehaltigen Oligosaccharide bestätigt werden konnten (vgl. Tabelle B 16 im Anhang). Insbesondere in den Fraktionen der Di- und Tetramere waren jedoch vergleichsweise hohe Anteile an Glucose nachweisbar, was vermutlich wiederum auf eine Co-Fraktionierung vergleichbar retardierter Verbindungen zurückzuführen ist. Auch hier konnte diese Vermutung über eine Reinjektion der isolierten Strukturen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Bei einem Vergleich der Chromatogramme der kommerziellen Pektine sind unterschiedliche Intensitäten der verschiedenen galacturonsäurehaltigen Verbindungen auszumachen. Dabei ist insbesondere bei den Pektinen CP1 - 3 das Signal der monomeren Galacturonsäure intensiver als bei den Pektinen AP1 - 2 und SBP. Zusätzlich sind die Signale der Tri- und Tetramere der Galacturonsäure bei CP1 und AP1 von höherer Intensität als bei den restlichen kommerziellen Pektinen. Im Gegensatz zu Ansatz A konnten in Fermentationsansatz B nach 4-stündiger *in vitro* Fermentation für CP2 keine oligomeren Pektine identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der Daten der gravimetrischen Bestimmung der nicht fermentierten Polysaccharide sowie deren Monosaccharidzusammensetzungen kann in der Zeitspanne zwischen 10 min und 4 h *in vitro* Fermentation auf eine schneller ablaufende Metabolisierung der Homogalacturonane in Fermentationsansatz B geschlossen werden. Während auch bei AP.L keine oligomeren Pektinstruktureinheiten in der ethanollöslichen Fraktion nach 4-stündiger Fermentationszeit nachweisbar waren, konnten für CP.L1 und CP.L2 galacturonsäurehaltige Oligosaccharide mit einem DP von 2 - 4 sowie das Galacturonsäuremonomer identifiziert werden. So kann tendentiell eine langsamere Umsetzung der Homogalacturonane von CP.L1 und CP.L2 im Vergleich zu den kommerziellen Pektinen vermutet werden.

Auch zu diesem Fermentationszeitpunkt konnten über die UHPLC-MS²-basierte Analyse intermediäre Spaltprodukte identifiziert werden. So konnte bei einem *m/z* von 369,25 ([M-H]⁻) wiederum das Dimer aus Galacturonsäureeinheiten in den Fermentationsansätzen von CP2, AP1

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

und AP2 gefunden werden (vgl. Abbildung B 12 im Anhang). Als ethanollösliche Verbindung nach 4-stündiger Fermentation von SBP wurde wie auch nach einer Fermentationszeit von 10 min das Galacturonsäureheptamer mit einer Methylierung nachgewiesen (vgl. Abbildung 24). Als zusätzliche Struktur konnte für CP1 und SBP über das einfach bzw. zweifach negativ geladene Ion mit einem $m/z = 601,44$ ($[M-H]^-$) bzw. $m/z = 300,22$ ($[M-2H]^{2-}$) ein Trimer aus Galacturonsäureeinheiten mit einer Methyl- und einer Acetylgruppe nachgewiesen werden. Über das Fragmentierungsmuster, welches in Abbildung 26 dargestellt ist, konnte die Struktur weiter charakterisiert werden. So wurde über einen Ringbruch der mittleren Galacturonsäureeinheit das Fragment $m/z = 323,29$ ($[^{0,2}A_2-H]^-$) erzeugt, worüber es möglich war, die Methylgruppe im Molekül auf die Galacturonsäureeinheiten 1 oder 2 ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende einzugrenzen. Zusätzlich konnte darüber die Lokalisierung der Acetylgruppe auf Galacturonsäureeinheit 2 (Position O-2) und 3 (Position O-2 oder O-3) beschränkt werden. Zusammen mit dem Fragment $m/z = 235,17$ ($[Y_1-H]^-$), was einer acetylierten Galacturonsäureeinheit entspricht, war die Acetylierung schließlich der reduzierenden Galacturonsäureeinheit zuzuordnen. Es war allerdings nicht möglich, anhand des Fragmentierungsmusters die Acetylierung eindeutig an Position O-2 bzw. O-3 der Galacturonsäureeinheit zu lokalisieren. Die Fragmente aus einer Bindungsspaltung $m/z = 193,13$ ($[C_1-H]^-$) und $m/z = 175,09$ ($[B_1-H]^-$) sowie aus einem Ringbruch $m/z = 133,09$ ($[^{0,2}A_1-H]^-$) können allesamt der unveresterten Galacturonsäureeinheit am nicht-reduzierenden Ende des Moleküls zugeordnet werden. So ist es möglich, die Methylierung an Galacturonsäureeinheit 2 zu lokalisieren.

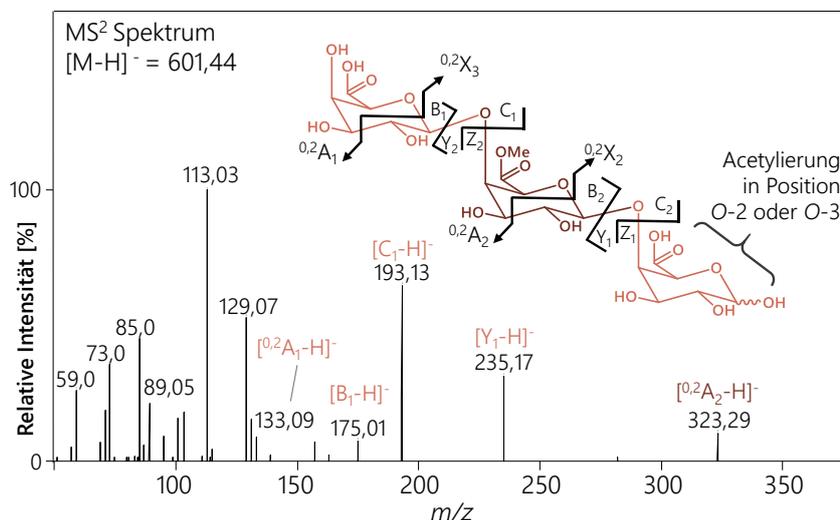


Abbildung 26: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS^2) des einfach negativ geladenen Ions eines Trimers aus Galacturonsäureeinheiten (GalA) mit einer Acetylierung an GalA 3 und einer Methylierung an GalA 2 ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende des Moleküls ($m/z = 601,44$ ($[M-H]^-$)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

Insgesamt bestätigte die UHPLC- MS^2 Analyse der ethanollöslichen Oligosaccharide die Beobachtungen der Analyse mittels HPAEC-PAD/MS bezüglich der Freisetzung galacturonsäurehaltiger Oligosaccharide. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in Übereinstimmung mit einer Studie

4. Ergebnisse und Diskussion

von Dongowski und Mitarbeitenden. Diese wiesen bei unterschiedlichen Citruspektinen nach einer *in vitro* Fermentation von 4 bis 6 h hohe Konzentrationen an freigesetzten oligomeren Galacturonsäurestruktureinheiten mittels HPAEC-PAD nach (Dongowski *et al.* 2000).

Nach einer Fermentationszeit von 24 und 48 h waren für die meisten Pektine keine Mono- bzw. Oligosaccharide mehr mittels HPAEC-PAD/MS (s. Abbildung 23) und UHPLC-MS² nachweisbar. Dies deutet auf eine nahezu vollständige Umsetzung der für die Fermentation zugänglichen Pektinstruktureinheiten der entsprechenden labortechnisch hergestellten und kommerziellen Pektine hin. Eine Ausnahme stellt dabei CP1 dar, bei welchem sowohl nach 24- als auch nach 48-stündiger *in vitro* Fermentation weiterhin monomere und dimere Galacturonsäure nachweisbar war. Insbesondere das Monomer wies dabei eine hohe Intensität zu beiden Fermentationszeitpunkten auf. Dies deutet auf eine langsamere Fermentation der Homogalacturonane von CP1 im Vergleich zu den restlichen untersuchten Pektinen hin.

Die Analyse der ethanollöslichen Strukturen der Fermentationsansätze von SBP mittels HPAEC-PAD/MS lieferte über Ionen entsprechender m/z Hinweise auf das Vorkommen von Oligosacchariden aus dem Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane. Mit Hilfe der CID konnte eine Fragmentierung der entsprechenden Ionen induziert werden (vgl. Abbildung B 13 im Anhang). Durch die geringe CID-Spannung von 100 eV wurden typischerweise Fragmente erzeugt, welche auf Spaltungen glykosidischer Bindungen basieren (Zaia 2004). Zusammen mit den Monosaccharidzusammensetzungen der präparativ isolierten Fraktionen (s. Tabelle B 16 im Anhang) war es möglich, drei Strukturen des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane eindeutig zu identifizieren. Dabei handelt es sich um ein Trimer aus zwei Rhamnosens und einer Galacturonsäure sowie ein Pentamer aus drei Rhamnose- und zwei Galacturonsäureeinheiten. Zusätzlich war es möglich, ein Tetramer bestehend aus zwei Rhamnosens und einer Galacturonsäure mit einer verknüpften Galactoseeinheit an der nicht-reduzierenden Rhamnoseeinheit als Fragment der Typ I Rhamnogalacturonane nachzuweisen. Die Signalintensitäten dieser Strukturen nehmen nach einer Fermentationszeit von 48 h für SBP weiter zu. So kann ein vergleichsweise spät beginnender Abbau des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane vermutet werden, welcher zwischen 24 und 48 h *in vitro* Fermentation tendenziell stärker ausgeprägt ist.

Auch mittels UHPLC-MS² waren für SBP nach 24- und 48-stündiger Fermentationszeit intermediäre Spaltprodukte identifizierbar. So war nach einer Fermentationszeit von 24 h über das in Abbildung 27 dargestellte Fragmentierungsmuster des Ions mit $m/z = 1111,89$ ($[M-2H]^{-}$) ein Hexamer bestehend aus zwei Rhamnose- und vier Galacturonsäureeinheiten mit zwei Acetylierungen und einer Methylgruppe nachweisbar. Über das Fragment mit $m/z = 485,42$ ($[C_3-H]^{-}$) konnte gezeigt werden, dass die Galacturonsäureeinheit, welche über Position O-1 und O-4 mit zwei Rhamnoseeinheiten glykosidisch verknüpft ist, unverestert vorliegt. Die Lokalisierung einer Acetylgruppe auf die Galacturonsäure 3 ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende des Hexamers wurde durch das Fragment $m/z = 703,58$ ($[C_4-H]^{-}$) ermöglicht. Dieses entspricht dem

4.4. *In vitro* Fermentation der Pektine mit humanen Fäzes

negativ geladenen Ion eines einfach acetylierten Tetramers aus zwei Rhamnose- und zwei Galacturonsäureeinheiten. Die Lokalisierung der Acetylgruppe kann durch das Fragment eines acetylierten Dimers aus Rhamnose und Galacturonsäure mit einem $m/z = 381,31$ bestätigt werden. Zusätzlich war es über das Ringbruchfragment $m/z = 643,46$ ($[^{0,2}A_4-H]^-$) möglich, die Acetylierung an Position O-3 der Galacturonsäureeinheit zu lokalisieren. Ein weiteres Ringbruchfragment von $m/z = 321,12$ ($[^{0,3}X_2-H]^-$) zusammen mit $m/z = 235,17$ und $m/z = 217,16$ grenzte die Lokalisierung der zweiten Acetylgruppe auf die reduzierende Galacturonsäureeinheit ein. Über das Ringbruchfragment war es zusätzlich möglich, die Methylgruppe als Bestandteil der Galacturonsäureeinheit 2 ausgehend vom reduzierenden Ende des Moleküls zu identifizieren.

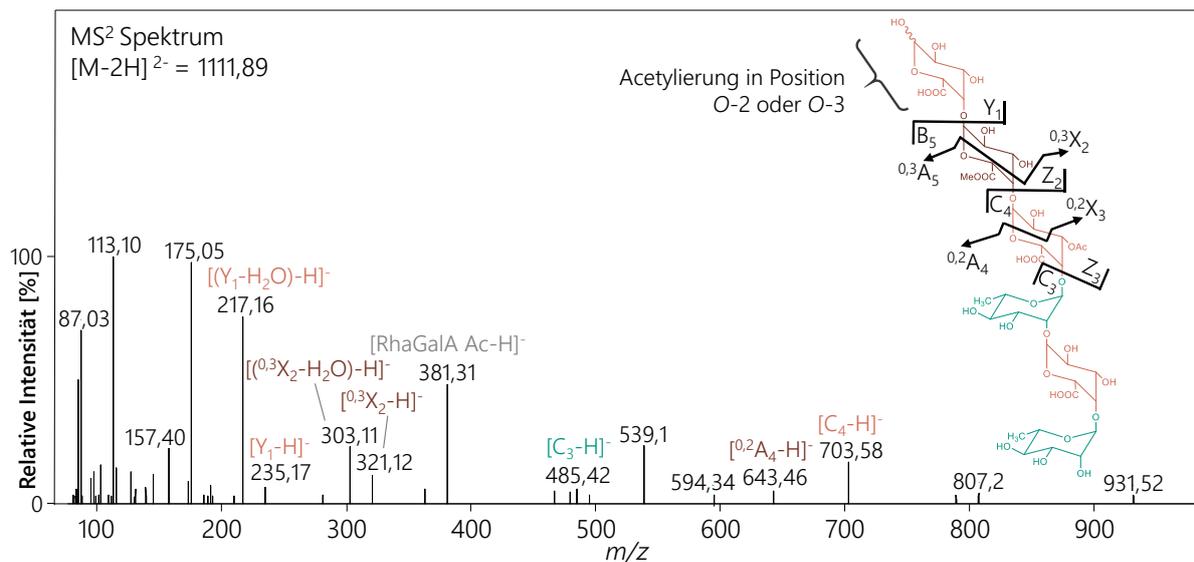


Abbildung 27: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS²) des zweifach negativ geladenen Ions eines Hexamers aus zwei Rhamnoseeinheiten (Rha, türkis) und vier Galacturonsäureeinheiten (GalA, rot) mit einer Acetylierung an GalA 1 und GalA 3 und einer Methylierung an GalA 2 ausgehend vom reduzierenden Ende des Moleküls ($m/z = 1111,89$ ($[M-2H]^{2-}$)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

Nach 48-stündiger Fermentationszeit war es auf Grundlage eines Ions mit $m/z = 807,68$ und dessen Fragmentierungsmuster möglich, ein einfach methyliertes Pentamer aus jeweils zwei Rhamnose- und Galacturonsäureeinheiten sowie einer Arabinoseeinheit zu identifizieren (s. Abbildung B 14 im Anhang). Die Methylgruppe konnte dabei anhand einer Ringspaltung mit $m/z = 381,1$ ($[^{0,3}X_3-H]^-$) an der Galacturonsäureeinheit in Position 3 ausgehend vom reduzierenden Ende des Moleküls lokalisiert werden. Daneben wurde durch das MS²-Spektrum des Ions mit $m/z = 621,50$ ($[M-2H]^{2-}$), die Struktur eines doppeltacetylierten Heptamers bestehend aus drei Rhamnosens und vier Galacturonsäuren vermutet (s. Abbildung B 15 im Anhang). Auf Basis der Spaltung von glykosidischen Bindungen konnten die beiden Acetylgruppen den Galacturonsäuren 1 und 2 ausgehend vom reduzierenden Ende des Moleküls zugeordnet werden. Da das Spektrum allerdings von vielen unspezifischen Fragmenten geprägt ist, kann die Identifizierung nicht als eindeutig angesehen werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend konnten in den Fermentationsansätzen von SBP sowohl durch die HPAEC-PAD/MS- als auch durch die UHPLC-MS²-basierte Analyse Fragmente des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane als intermediäre Spaltprodukte nachgewiesen werden. Das deutet bei diesem Pektinpräparat auf eine langsamere Metabolisierung des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane hin.

Insgesamt deuten die identifizierten intermediären Spaltprodukte, welche für alle Pektine in Tabelle B 17 im Anhang zusammengefasst sind, auf eine weitgehend pektinunabhängige Reihenfolge bei der Metabolisierung der verschiedenen Pektinstruktureinheiten hin. So wurden nach 10-minütiger Fermentationszeit zunächst Fragmente der galactosehaltigen neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane identifiziert, während nach 4 h für alle Pektine reine Galacturonsäuremono- und oligomere nachgewiesen wurden. Die in den 24- und 48-stündigen Fermentationsansätzen des SBP identifizierten Oligosaccharide aus dem Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane deuten darauf hin, dass dieses als letzte Struktureinheit im Pektin von den Enzymen der intestinalen Bakterien umgesetzt werden.

4.5. MURINE *IN VIVO* FERMENTATION DER PEKTINE

Für die *in vivo* Fermentationen im Mausversuch wurden die in Kapitel 3.2. beschriebenen Pektine CP2 und AP2 sowie die in Kapitel 4.1.3. beschriebenen Pektine CP.L1 und AP.L eingesetzt. Darüber hinaus wurde eine Kontrolle (Fütterung mit einem Anteil von 20 % Cellulose im Futter) mitgeführt. Die Probennahme erfolgte an einem Tag vor Beginn der Pektinsupplementierung und an zwei bis drei Tagen nach Beginn der Fütterung mit den unterschiedlichen Pektinen. Dabei wurden für CP2 und AP2 mit Pektinanteilen von 5 % bzw. 15 % im Futter unterschiedliche Mengen an Pektinen verfüttert und Proben nach den Tagen -1, 2, 7 und 13 genommen. Für CP.L1 und AP.L wurde sich auf eine Konzentration von 15 % im Futter beschränkt und eine Probennahme nach -7, 25 und 28 Tagen vorgenommen. Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Futterpellets sowie die Monosaccharidverteilungen der darin enthaltenen Polysaccharide sind in Tabelle B 1 und Tabelle B 2 im Anhang gezeigt. Die in den Kotpellets enthaltenen, auf Pektine (und Cellulose) zurückzuführenden Kohlenhydrate wurden durch Suspendieren der Kotpellets in 80 % Ethanol in ethanollösliche Oligosaccharide und in ethanolunlösliche Polysaccharide aufgetrennt und separat analysiert. Bei der gravimetrischen Bestimmung der nicht fermentierten Polysaccharide konnte kein Zusammenhang zwischen einer Fütterung mit Cellulose oder Pektinen ausgemacht werden.

4.5.1. Analyse der nicht fermentierten Polysaccharide

Als möglichen Anhaltspunkt auf fermentationsresistente Pektinstrukturen wurden die ethanolunlöslichen Strukturen hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung nach schwefelsaurer Hydrolyse sowie Methanolyse und TFA-Hydrolyse analysiert. Insgesamt ist bei der Beurteilung der Monosaccharidzusammensetzung zu beachten, dass lediglich die relativen

4.5. Murine *in vivo* Fermentation der Pektine

Anteile aller zugänglichen Kohlenhydrate in den Proben bestimmt wurden und so über absolute Mengen keine Aussagen getroffen werden können. Daher ist es auch nicht möglich, die Mengen an nicht fermentierten Pektinen in den Fäzes zwischen den verschiedenen eingesetzten Pektinen zu vergleichen.

Um bei Interpretation der Daten zu den in den Fäzes enthaltenen Polysacchariden einen Vergleich der Proben mit und ohne Pektinsupplementierung zu ermöglichen, wurden neben den Versuchsproben zusätzlich die Polysaccharidstrukturen der Kontrollproben untersucht (s. Tabelle B 18 im Anhang). Diese wurde zu allen Zeitpunkten der Probennahme von Glucose dominiert. Durch einen Vergleich der Anteile an Glucose nach Schwefelsäurehydrolyse mit jenen nach Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse ist eine Abschätzung des Anteils an Cellulose möglich, da diese lediglich unter den Bedingungen der Schwefelsäurehydrolyse aufgeschlossen werden kann. So kann mit einem Glucoseanteil von 32 - 33 mol% nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse und einem Anteil von 70 - 76 mol% nach Schwefelsäurehydrolyse vermutlich etwa die Hälfte des Glucoseanteils auf Cellulose zurückgeführt werden. Als weiterer Ursprung der Glucose in den ethanolunlöslichen Strukturen können Zellwände der in den Fäzes enthaltenen Bakterien vermutet werden. Diese beinhalten unter anderem Peptidoglykane und Lipopolysaccharide, welche Glucose als Bestandteil aufweisen können. Zusätzlich wurden geringe Mengen an Mannose und nach Methanolyse an Galactose, Arabinose und Rhamnose in den Polysacchariden der Fäzes nachgewiesen, welche ebenfalls vermutlich auf Bakterienzellwände zurückgeführt werden können (Chapot-Chartier und Kulakauskas 2014). Zusätzlich konnte mit 22 - 28 mol% nach Schwefelsäurehydrolyse und 52 - 60 mol% nach Methanolyse ein vergleichsweise hoher Anteil an Xylose in den Proben nachgewiesen werden. Dieser kann zumindest teilweise auf den in den Futterpellets enthaltenen, polymergebundenen Anteil an Xylose (10 mol% für das Kontrollfutter nach Schwefelsäurehydrolyse) zurückgeführt werden (vgl. Tabelle B 1 im Anhang). Bei der Herstellung der Futterpellets wurde handelsübliche, nicht gereinigte eingesetzt. Da Xylane aufgrund deren starker Assoziation an Cellulose in der pflanzlichen Zellwand bei der Cellulosegewinnung co-extrahiert werden könnte, kann die nachgewiesene Xylose erklärt werden.

Bei Betrachtung der Monosaccharidzusammensetzung der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Mäusefäzesproben nach Einsatz des Futters, welches 5 % CP2 enthielt, sind an den Tagen 2, 7 und 13 nach Beginn der Pektinfütterung sowohl nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse als auch nach Schwefelsäurehydrolyse Veränderungen im Vergleich zur Kontrollprobe auszumachen (vgl. Abbildung 28). Diese sind insbesondere durch den Nachweis geringer Anteile an Galactose nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse geprägt. Nach schwefelsäurebasierter Hydrolyse konnten neben geringen Anteilen an Galactose an Tag 7 und 13 mit 31 - 35 mol% vergleichsweise hohe Anteile an Galacturonsäure nachgewiesen werden. Der hohe molare Anteil an Galacturonsäure in den unfermentierten Kohlenhydraten der Mäusefäzes nach Schwefelsäurehydrolyse im Vergleich zur Hydrolyse mit methanolischer HCl/TFA lässt auf eine schwere hydrolytische Zugänglichkeit der

4. Ergebnisse und Diskussion

galacturonsäurehaltigen Kohlenhydrate der Mäusefäzesproben schließen, was möglicherweise durch eine Assoziation an schlecht zugängliche Bestandteile oder einen Einschluss der entsprechenden Kohlenhydrate hervorgerufen werden kann. So kann die unvollständige mikrobielle Umsetzung der Pektine in diesem Ansatz gegebenenfalls auf eine sterische oder strukturelle Unzugänglichkeit der Pektine für die bakteriellen Enzyme zurückgeführt werden.

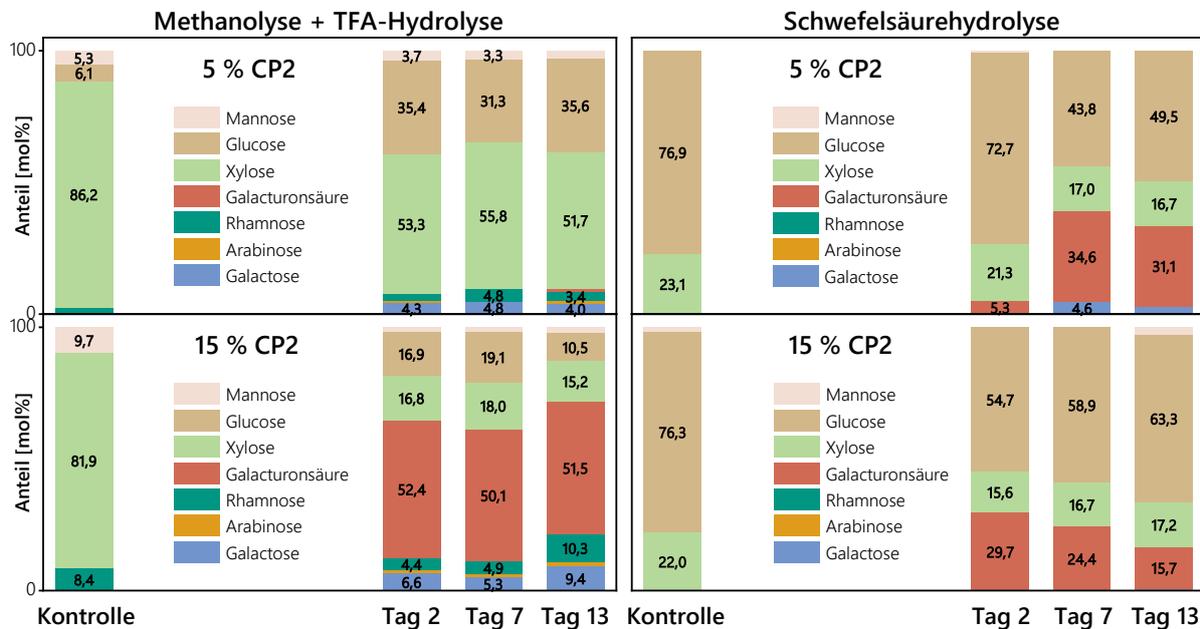


Abbildung 28: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mausversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 5 % bzw. 15 % des kommerziellen Citruspektins 2 (CP2) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die entsprechenden Zahlenwerte inklusive Standardabweichung sind in Tabelle B 19 und Tabelle B 20 dargestellt

Bei einer Fütterung der Mäuse mit einem Anteil von 15 % CP2 im Futter wurde nach Schwefelsäurehydrolyse ein Galacturonsäureanteil von 16 - 29 mol% für die nicht fermentierten Polysaccharide in den Fäzes der Mäuse nachgewiesen. Diese Anteile an Galacturonsäure sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Monosaccharidzusammensetzungen nach Schwefelsäurehydrolyse der in den Mäusefäzes enthaltenen Polysaccharide nach einer Fütterung mit einem Anteil von 5 % CP2 im Futter. Dahingegen wurden nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse deutliche Unterschiede zwischen den nicht fermentierten Kohlenhydraten in den Fäzes der Mäuse der unterschiedlich eingesetzten Pektinkonzentrationen im Futter ausgemacht. So lag der Anteil an Galacturonsäure mit höherem Anteil an CP2 (15 %) im Futter mit 50 - 52 mol% in einem deutlich höheren Bereich als bei einer Fütterung mit 5 % CP2 im Futter. Dies deutet darauf hin, dass eine vollständige enzymatische Umsetzung der Pektinstrukturen im Intestinaltrakt der Mäuse innerhalb der Transitzeit nicht möglich war. So können die nicht fermentierten Pektine in den Fäzesproben vermutlich auf eine konzentrationsbedingte unvollständige Metabolisierung zurückgeführt werden. Zusätzlich sind neben Galacturonsäure auch geringe Anteile an Galactose und Arabinose in den Proben nachweisbar. Da sowohl in den Kontrollfäzesproben (Tag -1) als auch in den

4.5. Murine *in vivo* Fermentation der Pektine

Futterpellets ohne Pektinzusatz keine oder nur geringe Anteile an Arabinose und Galactose als Polysaccharidbestandteile nachweisbar waren, lässt sich deren Herkunft vermutlich auf das dem Futter zugesetzte CP2 eingrenzen. Dies lässt vermuten, dass auch neutrale Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane bei Fütterung eines Futters, welches 15 % Pektin enthält, nicht vollständig umgesetzt werden. Die nachgewiesenen Anteile an Rhamnose mit 4 - 10 mol% lassen sich dahingegen nicht eindeutig auf die Struktur der dem Futter zugesetzten Pektine eingrenzen, da in den Kontrollproben bereits polymergebundene Rhamnose in den Mäusefäzesproben identifiziert wurde. So kann anhand der durchgeführten Analysen nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob auch Strukturen des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane in den Mäusefäzesproben enthalten sind.

Die Monosaccharidzusammensetzungen der nicht fermentierten Polysaccharide in den Fäzes der Mäuse nach einer Fütterung mit AP2-haltigem Futter (Pektinanteile von 5 % bzw. 15 %) sind nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse sowie nach Schwefelsäurehydrolyse in Abbildung 29 dargestellt. Hierbei war auffällig, dass bereits eine Fütterung mit 5 % AP2 im Futter in galacturonsäurehaltigen Polysacchariden in den Fäzes der Mäuse an allen Proben Tagen resultierte. Insbesondere nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse sind mit 21 - 26 mol% im Vergleich zur Fütterung von CP2 deutlich höhere Anteile an Galacturonsäure in den Kotpellets enthalten. Nach dem Aufschluss mittels Schwefelsäure sind bei einer Fütterung mit 5 % AP2 im Futter an allen Tagen nach Beginn der Fütterung etwa 7 mol% Galacturonsäure in den Fäzes der Mäuse nachweisbar. Dieser Wert stellt sich bei einem Vergleich zum Galacturonsäureanteil der Polysaccharide in den Kotpellets nach einer Fütterung mit einem Anteil von 5 % CP2 im Futter insbesondere an den Tagen 7 und 13 als vergleichsweise gering dar. Auf Grundlage dessen kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die nicht fermentierten Pektine in den Fäzes bei einer Fütterung mit einem Anteil von 5 % AP2 im Futter anders als bei einer Fütterung mit CP2 (5 % im Futter) vermutlich überwiegend nicht durch sterische Unzugänglichkeit, sondern aufgrund einer unzureichenden Transitzeit unmetabolisiert sind.

Bei einer Pektinkonzentration von 15 % AP2 im Futter ist ein höherer Galacturonsäureanteil in den Fäzes nachweisbar als bei der Fütterung von CP2 (15 % im Futter). Dieser beträgt 50 - 52 mol% bei Bestimmung nach Schwefelsäurehydrolyse und 36 - 57 mol% bei Bestimmung nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse. Zusätzlich sind nach beiden Hydrolyseverfahren Arabinose und Rhamnose in geringen Anteilen und Galactose (10 - 16 mol%) in vergleichsweise hohen Anteilen bestimmbar. Dies deutet neben nicht fermentierten Homogalacturonanstruktureinheiten auch auf Strukturen der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane in den Fäzes der Mäuse hin. So kann insgesamt eine langsamere Metabolisierung von AP2 im Vergleich zu CP2 vermutet werden. Ein möglicher Grund dafür kann der deutlich höhere DM von AP2 (57,0 %) im Vergleich zu CP2 (4,4 %) sein. Eine ähnliche *in vivo* Fermentationsstudie, bei welcher niedrig- und hochmethylierte Citruspektine (DM = 29 % bzw. 53 %) mit einem Anteil von 3 % im Futter

4. Ergebnisse und Diskussion

verfüttert wurden, wurde bereits mit Ratten durchgeführt. Dabei wurde über eine Probennahme des Cecuminhaltes eine schnellere Umsetzung des niedrigmethylierten Pektins festgestellt. Am Ende des Kolons war bei beiden Pektinen mit etwa 92 % ein ähnlicher Anteil an fermentierten Strukturen nachweisbar. So sind, anders als in der vorliegenden Arbeit, nur geringe Unterschiede in der Fermentierbarkeit der eingesetzten Pektine zu beobachten, sodass keine DM-abhängige Beeinflussung der Anteile an unfermentierten Pektinen in den Fäzes der Tiere auszumachen war (Tian *et al.* 2016). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in *in vivo* Fermentationsstudien von Dongowski und Mitarbeitenden mit konventionellen Ratten und keimfreien Ratten, denen humane Mikrobiota transplantiert wurde, erzielt werden. Dabei wurden niedrigmethylierte (DM = 34 %) und hochmethylierte (DM = 71 % sowie DM = 93 %) Citruspektine verfüttert. Durch dieahme von Fäzesproben sowie des Inhalts des Ileums, Cecums und Kolons am Ende des Experiments konnten Rückschlüsse auf die Fermentation der Pektine gezogen werden. So konnte eine langsamere Umsetzung der höhermethylierten Pektine gezeigt werden, wobei sich bei allen Pektinen der DM während der Fermentation im Gastrointestinaltrakt der Ratten nur geringfügig veränderte. Entgegen der Ergebnisse dieser Arbeit konnte bei den konventionellen Ratten bei einem Pektinanteil von 6,5 % im Futter für keine der eingesetzten Proben nicht fermentierte Pektine in den Fäzes nachgewiesen werden (Dongowski *et al.* 2002). Nyman und Asp führten ebenfalls eine Studie mit konventionellen Ratten durch, denen niedrigmethylierte (DM = 37 %) und hochmethylierte (DM = 74 %) Pektine mit einem Anteil von etwa 7,0 % im Futter verabreicht wurden. Für die Einschätzung der Fermentierbarkeit der Pektine wurde ein Vergleich des Galacturonsäuregehalts in den Pektinen sowie in den Fäzes der Ratten durchgeführt. So wurde für beide Pektine eine unvollständige Fermentation festgestellt, wobei für das niedrigmethylierte Pektin 19 % und für das hochmethylierte Pektin 25 % des ursprünglichen Galacturonsäuregehalts in den Fäzes der Ratten wiedergefunden wurde (Nyman und Asp 1982). Unterschiede zwischen den beschriebenen Studien und der hier vorliegenden Arbeit können vermutlich unter anderem auf abweichende DM der für die *in vivo* Fermentationsstudien eingesetzten Pektine zurückgeführt werden. So weisen die eingesetzten, niedrigmethylierten Pektine in den Veröffentlichungen mit 29 - 37 % einen deutlich höheren DM auf als das in der vorliegenden Arbeit verwendete CP2 (DM = 4,4 %). Zusätzlich variieren die Pektinanteile im Futter (3 - 7 %) und weichen von den in dieser Arbeit verwendeten Anteilen (5 % bzw. 15 %) ab. So können auch konzentrationsbedingte Unterschiede in der Fermentierbarkeit der Pektine zwischen den Studien nicht ausgeschlossen werden. Außerdem ist insgesamt bei einem Vergleich der Ergebnisse von Tian und Mitarbeitende (2016), Dongowski und Mitarbeitende (2002) sowie Nyman und Asp (1982) mit den vorliegenden Ergebnissen zu beachten, dass sich der Intestinaltrakt zwischen Mäusen und Ratten unterscheidet. So können beispielsweise aufgrund von Unterschieden in der Darmmikrobiota oder der Transitzeit, welche sich bei Ratten durchschnittlich als länger erwiesen hat als bei Mäusen, abweichende Ergebnisse erzielt werden (Enck *et al.* 1989; Hugenholtz und Vos 2018).

4.5. Murine *in vivo* Fermentation der Pektine

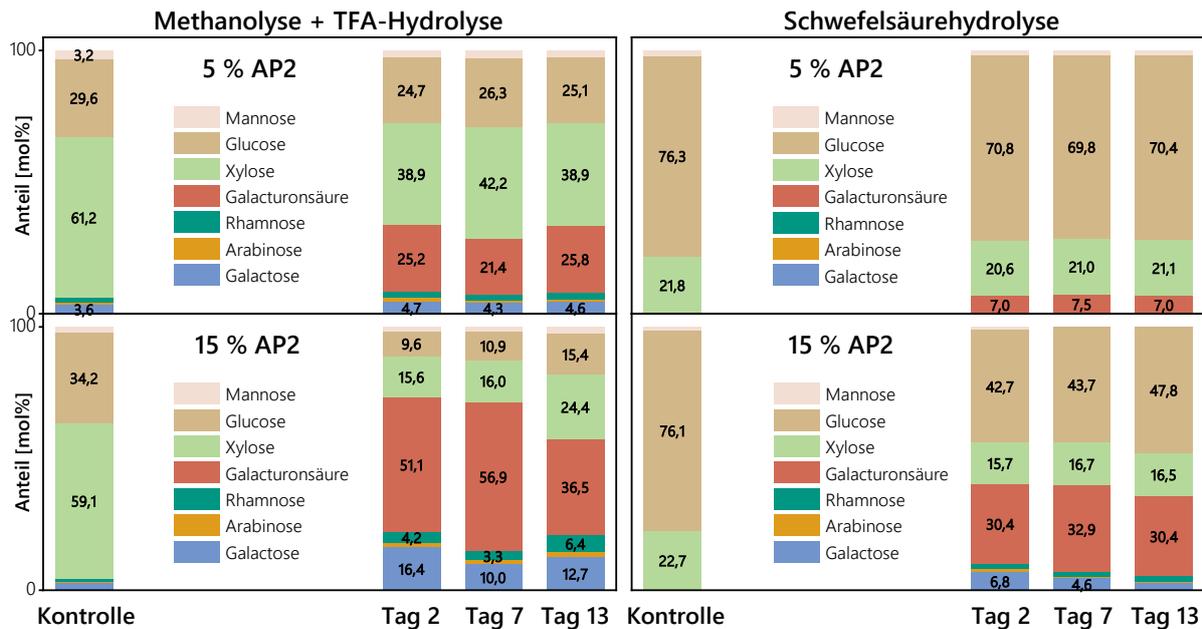


Abbildung 29: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mausversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 5 % bzw. 15 % des kommerziellen Apfelpektins 2 (AP2) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die entsprechenden Zahlenwerte inklusive Standardabweichung sind in Tabelle B 21 und Tabelle B 22 dargestellt

Bei Betrachtung der Ergebnisse zu den Fütterungsversuchen unter Einsatz der labortechnisch extrahierten Pektine ist zu beachten, dass die Mäuse vor der Probennahme über einen Zeitraum von 25 - 28 Tagen mit den Pektinen gefüttert wurden. So wurden sie über eine deutlich längere Zeitspanne vor der Probennahme mit Pektinen supplementiert als die Tiere, welche kommerzielle Pektine verabreicht bekamen (2 - 13 Tage). Ein Vergleich zwischen den Monosaccharidzusammensetzungen der Polysaccharide in den Fäzes der Mäuse zeigt einen höheren Anteil an Galacturonsäure (32 - 81 mol% nach Schwefelsäurehydrolyse) nach Supplementierung mit CP_L1 und AP_L als nach einer Fütterung von CP2 und AP2 (16 - 30 mol%, vgl. Abbildung 30). Auch nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse sind nach Fütterung der labortechnisch extrahierten Pektinen mit 48 - 64 mol% durchschnittlich höhere Anteile an Galacturonsäure in den nicht fermentierten Polysacchariden in den Fäzes der Mäuse nachweisbar als nach Fütterung der kommerziellen Pektine (37 - 57 mol%). So kann eine langsamere Umsetzung der Homogalacturonane der labortechnisch hergestellten Pektine angenommen werden. Dies kann vermutlich wieder auf die langsamere Umsetzung höhermethylierter Pektine zurückgeführt werden, da CP_L1 und AP_L mit 102,6 % bzw. 90,0 % durch nochmals höhere DM gekennzeichnet sind als AP2. Zusätzlich konnten nach Fütterung beider labortechnisch extrahierter Pektine geringe Anteile an Arabinose in den Fäzesproben bestimmt werden, welche nach Fütterung der Kontrolldiät nicht nachweisbar waren. So kann wie bei AP2 auf einen unvollständigen Abbau der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane geschlossen werden. Da beide eingesetzten labortechnisch hergestellten Pektine durch einen hohen Anteil an Arabinanen und (Arabino-)Galactanen gekennzeichnet sind

4. Ergebnisse und Diskussion

(vgl. Kapitel 4.2.), kann jedoch angenommen werden, dass der größte Teil der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane im Intestinaltrakt der Mäuse umgesetzt wurde. Bei Betrachtung des polymeregebundenen Rhamnoseanteils in den Fäzes wird sowohl bei CP_L1 als auch bei AP_L nach beiden Hydrolyseverfahren eine geringe Zunahme im Vergleich zur Kontrollprobe festgestellt. So kann auch auf einen geringen Anteil nicht fermentierten Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane geschlossen werden.

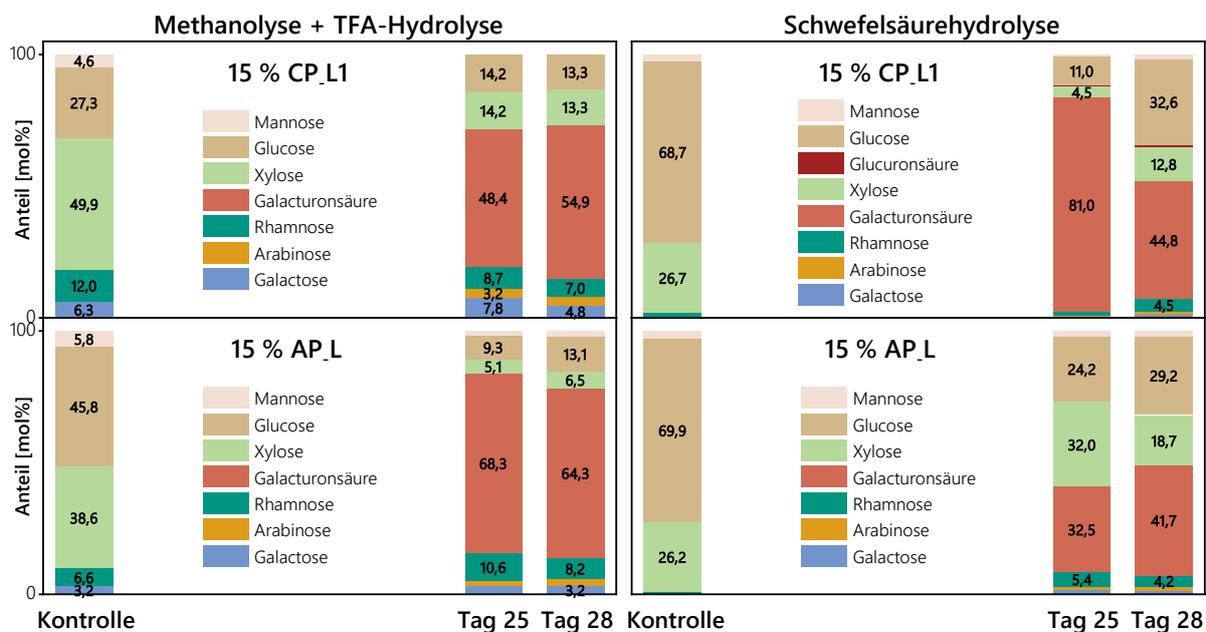


Abbildung 30: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mausversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 15 % des labortechnisch hergestellten Citruspektins 1 (CP_L1) sowie des labortechnisch hergestellten Apfelpektins (AP_L) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die entsprechenden Zahlenwerte inklusive Standardabweichung sind in Tabelle B 23 und Tabelle B 24 dargestellt

Nach Einsatz der beiden labortechnisch hergestellten Pektine zeigte sich nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse ein höherer Anteil an Galacturonsäure in den Fäzes der Mäuse nach einer Fütterung mit AP_L (64 - 68 mol%) im Vergleich zu einer Fütterung mit CP_L1 (48 - 55 mol%). Gleichzeitig sind nach Schwefelsäurehydrolyse nach einer Fütterung mit CP_L1 höhere Anteile an Galacturonsäure in den Polysacchariden in den Fäzes der Mäuse nachweisbar (45 - 81 mol%) als unter Einsatz von AP_L (33 - 42 mol%). So konnten anhand der ermittelten Daten zum Galacturonsäureanteil trotz abweichenden DM der beiden eingesetzten labortechnisch hergestellten Pektine keine eindeutigen Aussagen zu Unterschieden in der Fermentierbarkeit bzw. der Fermentationsgeschwindigkeit gemacht werden. Bei den Anteilen an Rhamnose, Galactose und Arabinose in den Polysacchariden der Fäzesproben sind dahingegen nach beiden Hydrolyseverfahren lediglich geringe Unterschiede zwischen den Pektinen auszumachen.

Insgesamt kann aus den hier erhaltenen Ergebnissen geschlossen werden, dass sowohl die neutralen Seitenketten als auch das Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane zu einem großen

Teil im Intestinaltrakt der Mäuse umgesetzt werden. Bei allen untersuchten Pektinen haben sich dahingegen insbesondere die Strukturen der Homogalacturonane unter den vorherrschenden Bedingungen als langsam fermentierbar erwiesen. Dabei hat sowohl die Ausgangsmenge an Pektinen in den Futterpellets als auch der DM der eingesetzten Pektine einen Einfluss auf den Anteil an Pektinstruktureinheiten in den polymeren Rückständen der Fäzesproben.

4.5.2. Identifizierung nicht fermentierter Mono-, Di- und Oligosaccharide

Für die Identifizierung möglicher mono-, di- und oligomerer Kohlenhydrate in den Fäzes der Mäuse nach Pektinfütterung wurde die ethanollösliche Fraktion in Wasser bzw. Acetonitril/Wasser (50/50) aufgenommen und mittels HPAEC-PAD/MS bzw. UHPLC-MS² analysiert. Um zu überprüfen, ob die Pektinfütterung ursächlich für die detektierten Signale ist, wurden die Fäzesproben der Kontrollgruppe mit einer Fütterung von Futterpellets mit einem Anteil von 20 % Cellulose und ohne Pektinabgabe ebenfalls auf ethanollöslichen Kohlenhydrate untersucht. Dabei wurden für die kommerziellen und labortechnisch erzeugten Pektine aufgrund der zeitlich versetzten Versuchsdurchführung jeweils getrennt voneinander Kontrollproben aufgearbeitet und analysiert. Die entsprechenden Chromatogramme sind zusammen mit den identifizierten Strukturen in Abbildung B 16 im Anhang dargestellt. Um individuelle Unterschiede zwischen den Mäusen mitzuerfassen, wurde für jede Variante der Pektinfütterung eine Probe vor Beginn der Pektin-supplementierung mitgeführt. Insgesamt ist bei einem Vergleich der Chromatogramme allerdings zu beachten, dass es nicht möglich war, die Proben zu trocknen und so einen Bezug auf die Trockenmasse vorzunehmen. Daher können Abweichungen im Wassergehalt der Fäzesproben in Unterschieden der Signalintensitäten führen. Zusätzlich kann der Wassergehalt die eingestellte Ethanolkonzentration und damit die Löslichkeit der Kohlenhydrate beeinflussen.

Die Chromatogramme der ethanollöslichen Fraktionen der Mäusefäzesproben nach einer Fütterung mit einem Anteil von 5 % sowie 15 % CP2 im Futter sind in Abbildung 31 dargestellt. Bei der geringeren Konzentration an Pektinen im Futter sind kaum Veränderungen zu der Kontrollprobe auszumachen. Mit Glucose, Maltose und einer weiteren Hexose sowie Pentose sind die gleichen Mono- und Disaccharide identifizierbar wie bei der Fütterung mit einem Anteil von 20 % Cellulose im Futter. Da keine pektincharakteristischen Strukturen nachgewiesen wurden, wurden bei einer Fütterung mit einem Anteil von 5 % CP2 im Futter keine oder nur sehr geringe Mengen an Spaltprodukten von Pektinen mit den Fäzes ausgeschieden. Daraus kann geschlossen werden, dass die enzymatisch zugänglichen Pektinstruktureinheiten im Intestinaltrakt der Mäuse weitgehend in ihre Fermentationsendprodukte umgesetzt wurden. Nach Fütterung mit einem Anteil von 15 % CP2 im Futter sind im Vergleich zu der geringeren Pektinabgabe einige Signale mehr in der ethanollöslichen Fraktion der Fäzes der Mäuse auszumachen. Dabei konnte über das $m/z = 201$ und die charakteristische Retentionszeit von 38,2 min Galacturonsäure als Monomer an allen drei untersuchten Tagen nach Beginn der Pektinfütterung nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Zusätzlich wurde anhand der Retentionszeit (66,3 min) das Dimer aus zwei α -1,4-glykosidisch verknüpften Galacturonsäureeinheiten in geringer Intensität in den Proben vermutet. Dies wurde zusätzlich über die Isolierung der entsprechenden Verbindung mit anschließender Analyse der Monosaccharidzusammensetzung bestätigt (vgl. Tabelle B 25 im Anhang). So lässt sich hier auf eine unvollständige Metabolisierung der freigesetzten intermediär auftretenden Spaltprodukte des Pektins CP2 während der Verdauung im Intestinaltrakt der Mäuse schließen. Da nach Fütterung der geringeren Menge an CP2 keine mono- und oligomeren Pektinstruktureinheiten in den Fäzes nachweisbar waren, kann diese unvollständige Umsetzung auf den erhöhten Pektinanteil im Futter zurückgeführt werden. Dafür ursächlich ist vermutlich, dass die Aktivität der pektinabbauenden bakteriellen Enzyme im Kolon der Mäuse nicht ausreichend ist, um diese Mengen an Pektinen innerhalb der Transitzeit vollständig zu metabolisieren.

Nach Fütterung von AP2 ist bereits bei einem Pektinanteil von 5 % in den Futterpellets das Mono- und Dimer der Galacturonsäure nachweisbar (s. Abbildung 31). Zusätzlich war es über die Zuordnung der Retentionszeit von 76,4 min sowie die Monosaccharidzusammensetzung der entsprechenden präparativ isolierten Verbindung möglich, ein Oligosaccharid aus Galacturonsäure mit einem DP von 3 zu identifizieren (vgl. Tabelle B 25 im Anhang). Dies deutet wie die zuvor dargestellten Monosaccharidzusammensetzungen der nicht ethanollöslichen Polysaccharide an, dass AP2 bereits ab einem Anteil von 5 % im Futter nicht vollständig im Intestinaltrakt der Mäuse metabolisiert wird. Zusätzlich wird auch hier die langsamere Fermentation von AP2 im *in vivo* Mausmodell im Vergleich zu CP2 deutlich, was, wie bereits in Kapitel 4.5.1. beschrieben, vermutlich auf den höheren DM zurückzuführen ist. Mit Erhöhung des Anteils an AP2 in den Futterpellets der Mäuse werden in den Chromatogrammen der ethanollöslichen Fäzesfraktionen deutlich mehr Signale mittels HPAEC-PAD Analyse erfasst. So kann gezeigt werden, dass nach Fütterung größerer Mengen an Pektinen eine höhere Menge an unterschiedlichen mittels PAD erfassbaren Verbindungen in den Fäzes der Mäuse enthalten ist. Allerdings können diese nicht auf Mono- und Oligosaccharide eingegrenzt werden, da beispielsweise auch Aminosäuren mittels PAD detektiert werden können (Martens und Frankenberger 1992). Dennoch deutet dies auch auf eine weniger ausgeprägte Umsetzung der im Futter enthaltenen fermentierbaren Kohlenhydrate hin. Als Pektinstruktureinheiten wurden wiederum das Mono-, Di- und Trimer der Galacturonsäure in der ethanollöslichen Fraktion der Fäzesproben der Mäuse nachgewiesen. Zusätzlich war es unter diesen Bedingungen möglich, Cellobiose in den Fäzes über das $m/z = 349$, die charakteristische Retentionszeit sowie die Monosaccharidzusammensetzung der präparativ isolierten Verbindung nachzuweisen (vgl. Tabelle B 25 im Anhang). In anderen Fäzesproben konnte Cellobiose nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass durch eine Supplementierung der Mäuse mit hochmethyliertem Pektin die Fermentierbarkeit von Cellulose rückläufig ist. Ähnliche Ergebnisse konnten in einer *in vivo* Studie mit Ratten erzielt werden, bei welcher das verabreichte Futter 3 % an niedrig- bzw.

4.5. Murine *in vivo* Fermentation der Pektine

hochmethylierten Citruspektinen enthält. Dabei wurde die Fermentierbarkeit der Cellulose von etwa 59 % (Kontrolldiät) auf rund 27 % (Diät mit niedrigmethylierten Pektinen) bzw. rund 21 % (Diät mit hochmethylierten Pektinen) reduziert (Tian *et al.* 2016).

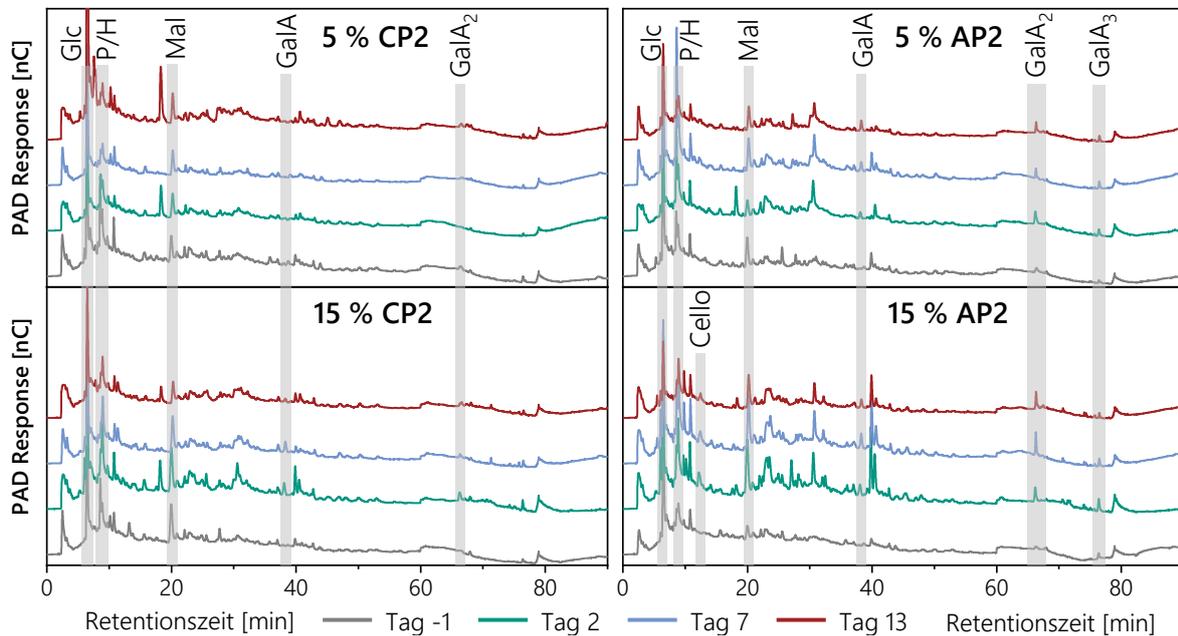


Abbildung 31: Chromatogramme der ethanollöslichen Fraktionen der Fäzesproben der Mäuse nach Fütterung mit einem Anteil an 5 % bzw. 15 % des kommerziellen Citruspektins 2 (CP2) und des kommerziellen Apfelpektins 2 (AP2) im Futter. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigten Mono-, Di- und Oligosaccharide wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Die zugehörigen Signale sind durch graue Balken gekennzeichnet. Cello: Cellobiose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, H: Hexose, Mal: Maltose, P: Pentose

Über die UHPLC-MS²-basierte Analyse der ethanollöslichen Kohlenhydrate in den Fäzes der Mäuse war es möglich, für alle Fäzesproben der mit AP2 supplementierten Mäuse (sowohl 5 % als auch 15 % Pektinanteil im Futter) ein methyliertes Dimer aus Galacturonsäure nachzuweisen (vgl. Abbildung 32). Die Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen den Galacturonsäureeinheiten resultierte dabei in einem Fragment mit dem m/z von 207,16, welches einer methylierten Galacturonsäureeinheit entspricht. Zusätzlich konnte das B₁- / Z₁-Fragment mit einem m/z von 175,01 identifiziert werden, was aus einer unmethylierten Galacturonsäureeinheit resultiert. Das Fragment mit $m/z = 113,02$ kann vermutlich einer Ringbruchfragmentierung ($[^{0,2}A_1-H]^-$) der nicht-reduzierenden Galacturonsäureeinheit zugeordnet werden. Da es sich hierbei um die Fragmentierung einer unmethylierten Einheit handelt, liegt die Methylgruppe vermutlich an der Galacturonsäureeinheit am reduzierenden Ende des Disaccharids vor. Für die Proben nach einer Fütterung der Mäuse mit unterschiedlichen Anteilen an CP2 im Futter war es für keine der untersuchten Proben möglich, Pektinfragmente mittels UHPLC-MS² zu identifizieren. Dies unterstützt die Ergebnisse der HPAEC-PAD/MS-basierten Analyse.

4. Ergebnisse und Diskussion

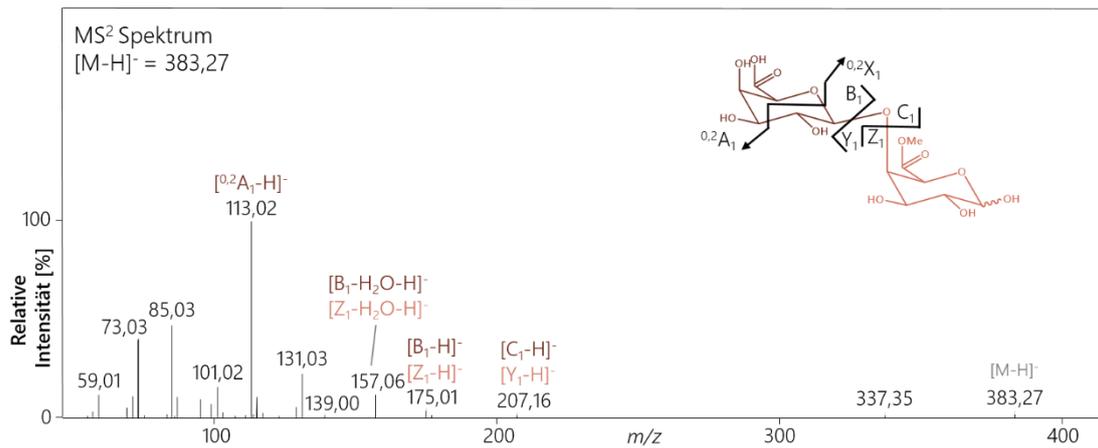


Abbildung 32: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS^2) des einfach negativ geladenen Ions eines Dimers aus Galacturonsäureeinheiten mit einer Methylgruppe an der reduzierenden Galacturonsäureeinheit ($m/z = 383,27$ ($[M-H]^-$)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

Die Analyse der ethanollöslichen Fraktionen der Fäzesproben nach einer Fütterung mit 15 % CP-L1 und AP-L ergibt deutlich weniger komplexe Chromatogramme als nach einer Fütterung mit 15 % der kommerziellen Pektine (s. Abbildung 33). Dies deutet auf eine geringere Menge an PAD-detectierbaren Substanzen in den ethanollöslichen Fraktionen der Fäzes der Mäuse und so auf eine stärker ausgeprägte vollständige Umsetzung bzw. Resorption dieser Verbindungen hin. Auch waren, anders als bei den kommerziellen Pektinen, keine galacturonsäurehaltigen Kohlenhydrate mittels HPAEC-PAD/MS nachweisbar. Gleichzeitig war es auch über die UHPLC- MS^2 -basierte Analyse nicht möglich, pektincharakteristische Oligosaccharide zu identifizieren. Zusammen mit den höheren Anteilen an polymergebundener Galacturonsäure in den nicht ethanollöslichen Fraktionen der Fäzes lässt dies vermuten, dass insbesondere bestimmte Homogalacturonan-Struktureinheiten der beiden eingesetzten labortechnisch extrahierten Pektine für die kolonalen Enzyme der Mäuse schlechter zugänglich sind als die kommerziellen Pektine. Die zugänglichen Strukturen scheinen dahingegen im Verlauf der murinen Verdauung nahezu vollständig in ihre Fermentationsendprodukte umgesetzt zu werden.

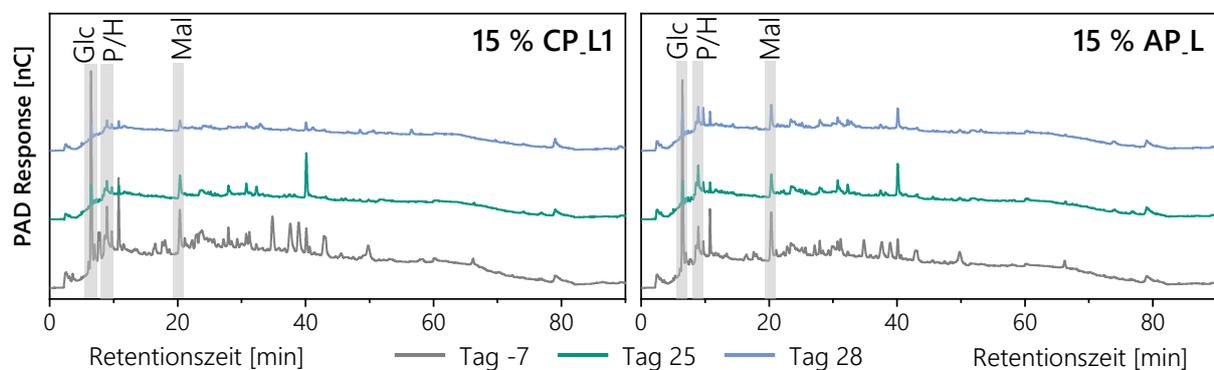


Abbildung 33: Chromatogramme der ethanollöslichen Fraktionen der Fäzesproben der Mäuse nach Fütterung mit einem Anteil von 15 % des labortechnisch extrahierten Citruspektins 1 (CP-L1) oder des labortechnisch extrahierten Apfelpektins (AP-L) im Futter. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigten Mono- und Disaccharide wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Die zugehörigen Signale sind durch graue Balken gekennzeichnet. Glc: Glucose, H: Hexose, Mal: Maltose, P: Pentose

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass bei einer Umsetzung der hier eingesetzten Pektine im *in vivo* Mausmodell überwiegend Homogalacturonan-basierte Einheiten als unvollständig umgesetzte Strukturen in den Fäzes zurückbleiben. So kann auch auf Grundlage der identifizierbaren Oligosaccharide auf eine schnellere Metabolisierung der neutralen Seitenketten und des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane unter diesen Bedingungen geschlossen werden.

4.6. HUMANE *IN VIVO* FERMENTATION DER PEKTINE

Für die *in vivo* Fermentation der Pektine in der Humanstudie wurde das in Kapitel 3.2. beschriebene Pektin AP2 eingesetzt. Den Probandinnen und Probanden der aktiven Gruppe wurde eine Dosis von 20 g Pektin pro Tag über 60 Tage verabreicht (vgl. Kapitel 3.4.4.). In der Kontrollgruppe wurden 5 g Maltodextrin als Placebo eingesetzt. Sowohl bei der aktiven als auch der Placebogruppe wurden vor Beginn (an Tag 0) und 60 Tage nach der ersten Supplementierung Fäzesproben gesammelt, in PBS suspendiert und bei -80 °C gelagert. Die darin enthaltenen Kohlenhydrate wurden wie in den Kapiteln zuvor beschrieben durch das Einstellen einer Ethanolkonzentration von 80 % in ethanollösliche Oligosaccharide und in ethanolunlösliche Polysaccharide aufgetrennt und separat analysiert. Auch hier konnte bei der gravimetrischen Bestimmung der nicht fermentierten, ethanolunlöslichen Polysaccharide kein Unterschied zwischen der aktiven und der Placebogruppe ausgemacht werden.

4.6.1. Analyse der nicht fermentierten Polysaccharide

Um Rückschlüsse auf mögliche fermentationsresistente bzw. langsam fermentierbare Struktureinheiten des eingesetzten Pektins bei der humanen Verdauung ziehen zu können, wurden die ethanolunlöslichen Kohlenhydrate hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung nach Schwefelsäurehydrolyse sowie Methanolyse und TFA-Hydrolyse analysiert. Dabei wurde eine Co-Elution von Rhamnose und Galactosamin als Bestandteil einiger bakterieller Zellwände festgestellt. Um dennoch den Rhamnoseanteil semiquantitativ bestimmen zu können, wurde der Gradient zur Elution angepasst und eine separate Kalibrierung der beiden Monosaccharide durchgeführt (vgl. Kapitel 8.2.1.). Aufgrund der damit einhergehenden unzureichenden Auftrennung anderer, in den Proben enthaltener Monosaccharide wurde die Monosaccharidzusammensetzung anhand des ursprünglichen Gradienten ermittelt. Mit dem Verhältnis von Rhamnose zu Galactosamin konnte die initiale Gesamtpeakfläche der beiden Strukturen auf den Anteil an Rhamnose verrechnet werden. Die Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzungen der Polysaccharide der humanen Fäzesproben sind in Tabelle B 26 im Anhang für die Placebogruppe und in Tabelle B 27 im Anhang für die aktive Gruppe dargestellt.

Die Ergebnisse für die Placebogruppe (ProbandIn 1 - 5) vor Beginn der Studie zeigen nach beiden Hydrolysevarianten überwiegend die Monosaccharide Galactose, Rhamnose und Glucose als

4. Ergebnisse und Diskussion

Polymerbausteine. Diese können einerseits aus den Zellwandpolysacchariden der kolonalen Bakterien stammen, andererseits sind unfermentierte Nahrungsbestandteile als mögliche Quelle für die polymeregebundenen Monosaccharide denkbar. So könnte ein Teil der Glucose beispielsweise auf nicht fermentierte Cellulose zurückgeführt werden. Deren Anteil kann durch einen Vergleich zwischen dem Glucoseanteil nach Schwefelsäurehydrolyse mit jenem nach Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse abgeschätzt werden. Da die Glucoseanteile zwischen den beiden Hydrolysearten lediglich geringe Unterschiede aufweisen, scheint der Anteil an Cellulose in den ethanolunlöslichen Fraktionen der humanen Fäzesproben anders als bei den murinen Fäzesproben vergleichsweise gering zu sein. Da eine genaue Erfassung der Nahrungsaufnahme der Probandinnen und Probanden nicht vorliegt, kann ein Vergleich zwischen muriner und humaner Diät diesbezüglich nicht vorgenommen werden. Allerdings ist bei den Mäusen die Cellulosezufuhr je nach Pektindiät mit 5 % bzw. 15 % geregelt, wodurch eine konstantere und höhere Aufnahme an Cellulose vermutet werden kann. Eine weitere Eingrenzung der Herkunft der polymeregebundenen Monosaccharide in den Fäzesproben kann über die vorliegenden Daten nicht erfolgen.

Die ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben setzen sich auch nach Beendigung der 60-tägigen Kontrolldiät weiterhin überwiegend aus Galactose, Rhamnose und Glucose zusammen. Die geringfügigen Unterschiede zu den Zusammensetzungen der Polysaccharide in den Fäzesproben vor Beginn der Studie können vermutlich teilweise auf Abweichungen in der Nahrungszusammensetzung der Probandinnen und Probanden zu den verschiedenen Zeitpunkten der Studie zurückgeführt werden. Außerdem ist eine Veränderung der kolonalen Mikrobiota im Verlauf der Studie denkbar, was in Unterschieden in der Polysaccharidzusammensetzung der Kohlenhydrate in den Fäzes resultieren kann. Diese kann durch eine Variation in der Diät der Probandinnen und Probanden hervorgerufen werden. So konnte beispielsweise in einem *in vitro* Modell des proximalen Kolons (TIM-2 System) gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der Mikrobiota innerhalb einer Zeitspanne von 24 h ernährungsspezifisch anpassen kann (Aguirre *et al.* 2016). Zusätzlich wurde in einer Studie mit 28 Probandinnen und Probanden unter anderem ein Zusammenhang zwischen der Frequenz sowie dem Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme und der Zusammensetzung der Bakterien in den Fäzesproben hergestellt (Kaczmarek *et al.* 2017). Insgesamt können somit in der Placebogruppe keine relevanten Unterschiede in den Monosaccharidzusammensetzungen der Polysaccharidstrukturen in den Fäzes vor und nach Beginn der Aufnahme der Kontrolldiät beobachtet werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die über eine normale westliche Diät aufgenommenen Pektine ohne zusätzliche Supplementierung vermutlich weitgehend vollständig im humanen Intestinaltrakt metabolisiert werden, sodass keine polymeren Pektinstruktureinheiten mehr in den Fäzes nachweisbar sind.

4.6. Humane *in vivo* Fermentation der Pektine

Die Polysaccharidzusammensetzung der Kohlenhydrate in den humanen Fäzesproben der Probandinnen und Probanden der aktiven Gruppe ist vor Beginn der kontrollierten Pektinaufnahme ähnlich wie bei der Placebogruppe durch Galactose, Rhamnose und Glucose als Hauptmonosaccharide geprägt (vgl. Tabelle B 27 im Anhang). Nach 60-tägiger Pektinsupplementierung sind in den nicht fermentierten Polysacchariden anhand der Monosaccharidzusammensetzungen individuelle Unterschiede zwischen den Probandinnen und Probanden auszumachen. Dabei zeichneten sich die ethanolunlöslichen Kohlenhydrate der Fäzesproben der Probandinnen und Probanden 6, 8, 9, 12 und 13 wiederum überwiegend durch Galactose, Rhamnose und Glucose aus. So kann bei diesen Probandinnen und Probanden trotz erhöhter Pektinzufuhr auf eine weitgehend vollständige Umsetzung der polymeren Pektine in mono-, di- und/oder oligomere Spaltprodukte oder SCFA als Fermentationsendprodukte geschlossen werden. Zusätzlich lässt sich bei den Probandinnen und Probanden 6 und 9 über das Verhältnis des Glucoseanteils nach Schwefelsäurehydrolyse und Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse ein höherer Anteil an Cellulose in den Fäzes nach der Pektinsupplementierung vermuten. So wäre auch hier eine verlangsamte Umsetzung möglicher zugänglicher Cellulose durch einen erhöhten Pektinanteil in der Nahrung möglich (vgl. Kapitel 4.5.2.).

Bei den Probandinnen und Probanden 7, 10 und 11 konnte nach der täglichen Pektinzufuhr von 20 g mit beiden Hydrolyseverfahren jeweils Galacturonsäure in den ethanolunlöslichen Polysacchariden der Fäzesproben nachgewiesen werden. Mit etwa 30,0 mol% nach Schwefelsäurehydrolyse und mit 23,7 mol% nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse war dieser Anteil bei Probandin oder Proband 7 am höchsten, während die Fäzesproben der Probandinnen und Probanden 10 und 11 mit 9,2 mol% und 6,5 mol% bzw. 8,6 mol% und 9,2 mol% geringere Anteile an Galacturonsäure aufwiesen. Bei Probandin oder Proband 14 war nur nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse ein Galacturonsäureanteil von 2,0 mol% in den Polysacchariden der Fäzesproben zu bestimmen. Neben Galacturonsäure war in der Probe von Probandin oder Proband 10 nach der Pektinsupplementierung zusätzlich mit 4,7 mol% nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. 7,8 mol% nach Methanolyse/TFA-Hydrolyse ein erhöhter Anteil an Arabinose bestimmbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Pektine im Kolon der Probandinnen und Probanden 7, 10, 11 und 14 unvollständig abgebaut und teilweise im polymeren Zustand ausgeschieden wurden. Während sich die unfermentierten Struktureinheiten bei den Probandinnen und Probanden 7, 11 und 14 vermutlich auf Homogalacturonane beschränken, lassen die Anteile an Arabinose bei Probandin oder Proband 10 auf unfermentierte Strukturen der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane schließen. Die unterschiedlichen Anteile an pektincharakteristischen Monosacchariden in den Fäzesproben zeigen dabei wiederum starke individuelle Unterschiede in der Fermentation von Pektinen, was vermutlich auf Unterschiede in der intestinalen Mikrobiota und damit in den bakteriellen CAZymes zurückzuführen ist.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.6.2. Identifizierung nicht fermentierter Mono-, Di- und Oligosaccharide

Zur Identifizierung möglicher mono-, di- und oligomerer Kohlenhydrate in den humanen Fäzesproben wurden die ethanollöslichen Fraktionen zunächst über eine PGC-Kartusche entsalzt und anschließend in Wasser bzw. Acetonitril/Wasser (50/50, v/v) aufgenommen und mittels HPAEC-PAD/MS sowie UHPLC-MS² analysiert. Um mögliche Unterschiede auf die Pektin-supplementierung zurückzuführen, wurden zusätzlich sowohl von der aktiven als auch von der Placebogruppe vor Beginn der kontrollierten Diät die Fäzesproben hinsichtlich mono-, di- und oligomerer Kohlenhydrate untersucht.

Die Chromatogramme der Placebogruppe nach HPAEC-PAD/MS Analyse sind in Abbildung B 17 im Anhang dargestellt. Unter Berücksichtigung der m/z und der Retentionszeiten waren in den Fäzesproben teilweise Glucose, Cellobiose und Maltose nachweisbar. Zusätzlich konnten vereinzelt weitere Oligomere aus Hexosen nachgewiesen werden, welche allerdings keiner eindeutigen Struktur zugeordnet werden konnten. Zwischen den Chromatogrammen der ethanollöslichen Verbindungen der Fäzesproben vor und nach der Placebodiät konnten bei den Probandinnen und Probanden 1, 3 und 4 lediglich geringe Unterschiede ausgemacht werden. Dahingegen waren bei den Probanden 2 und 5 vor Beginn der Studie Signale der Cellobiose in hohen Intensitäten nachweisbar. Zum Abschluss der Studie waren diese Signale von deutlich geringerer Intensität. So kann auch hier auf individuelle Unterschiede zwischen den Probandinnen und Probanden in der Fermentation von Polysacchariden geschlossen werden. Ebenfalls deuten die Veränderungen in den Chromatogrammen auf Varianzen im Fermentationsprozess innerhalb der einzelnen Individuen hin.

Auch in den Fäzesproben der aktiven Gruppe sind überwiegend Glucose, Cellobiose und Maltose in den ethanollöslichen Strukturen enthalten (vgl. Abbildung B 18 im Anhang). Dahingegen war es in keiner Probe möglich, mittels HPAEC-PAD/MS pektincharakteristische Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide in den Fäzesproben nachzuweisen. Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse mittels UHPLC-MS² bestätigt. So kann für alle Proben der Probandinnen und Probanden, die eine Pektinsupplementierung erhielten, geschlossen werden, dass die abgebauten Pektinstruktureinheiten bereits in ihre Fermentationsendprodukte umgesetzt wurden. Zusammen mit dem Nachweis von Galacturonsäure in den Polysacchariden der Fäzesproben der Probandinnen und Probanden 7, 10, 11 und 14 kann eine Unzugänglichkeit der unfermentierten Pektine für die bakteriellen Enzyme der genannten Studienteilnehmenden vermutet werden. Andererseits könnten individuelle Unterschiede in der Transitzeit, welche unter anderem durch die Ernährung beeinflusst werden kann, zu einer unterschiedlichen Fermentierbarkeit der Pektine führen. Bei den Probandinnen und Probanden 6, 8, 9, 12 und 13 deuten die Ergebnisse dahingegen darauf hin, dass das eingesetzte Pektin AP2 weitgehend vollständig fermentiert wurde.

4.7. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Durch die Verwendung strukturell unterschiedlicher Pektine war es möglich, strukturbasierte Untersuchungen zum Abbau und zur Abbaukinetik von Pektinen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Fermentationssystemen durchzuführen. Um die in der Praxis bedeutsamen industriell hergestellten Pektine zu berücksichtigen, wurden die Versuche mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Pektinen aus Apfeltrester, Citruschalen und Zuckerrübenschnitzeln durchgeführt. Deren strukturelle Vielfalt ist allerdings aufgrund der rechtlichen Definition von Pektinen, wonach diese als Lebensmittelzusatzstoff unter anderem einen Mindestgehalt an Galacturonsäure von 65 % aufweisen müssen, limitiert (VO (EG) Nr. 1333/2008; VO (EU) Nr. 231/2012). Diese Vorgaben stehen in Widerspruch zu den Strukturen der meisten in der pflanzlichen Zellwand vertretenen Pektine, welche durch einen hohen Anteil an arabinose- und galactosehaltigen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane geprägt sind. Insbesondere deren Struktur wird in kommerziellen Pektinen unterrepräsentiert, da die glykosidischen Bindungen zwischen den Monomereinheiten der neutralen Seitenketten unter den harschen, industriell eingesetzten Säureextraktionsbedingungen präferiert gespalten werden. Daher wurden unter milderer labortechnischen Bedingungen insgesamt drei Pektine aus Apfeltrester und Citruschalen extrahiert, um während der Fermentationsprozesse ein zusätzliches Augenmerk auf die neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane legen zu können.

Eine umfassende Strukturcharakterisierung der Pektine sollte die Grundlage darstellen, um Zusammenhänge zwischen der Fermentation und den strukturellen Besonderheiten der Pektine herzustellen. Dabei wurde das gesamte Portfolio der in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie etablierten Methoden eingesetzt. So konnten Unterschiede in den Anteilen und der Komplexität der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane ausgemacht werden. Die meisten untersuchten kommerziellen Pektine waren dabei durch überwiegend lineare Arabinan- und (Arabino-)Galactanstrukturen gekennzeichnet und wiesen einen hohen Anteil an Homogalacturonanen auf. Als Ausnahme wies SBP Strukturen der Typ II (Arabino-)Galactane sowie vergleichsweise verzweigte Arabinane mitsamt eines hohen Substitutionsgrades des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane auf. Bei den labortechnisch hergestellten Pektinen zeichneten sich die neutralen Seitenketten überwiegend durch lineare Strukturen mit vereinzelt höherverzweigten Bereichen in den Arabinanen aus. Alle untersuchten Apfelpektine waren durch Xylogalacturonane als vermutliche Rückgratstruktureinheit geprägt. Weitere strukturelle Unterschiede wurden in Bezug auf die Acetylierung gefunden. So wurde für SBP und AP-L ein vergleichsweise hoher DAc nachgewiesen. Für Zuckerrübenpektine wurde dies bereits beschrieben, während die Acetylierung in Apfelpektinen in der Literatur bisher eine eher untergeordnete Rolle spielt (Dea und Madden 1986; Bindereif *et al.* 2021; Voragen *et al.* 1986).

4. Ergebnisse und Diskussion

Weitreichende Unterschiede waren zusätzlich im DM der Galacturonsäureeinheiten (4,4 - 102,6 %) sowie dem M_w auszumachen (38 - 417 kDa).

Im Zuge des simplifizierten *in vitro* Fermentationsansatzes mit unterschiedlichen Enzymgemischen war es nicht möglich, Unterschiede im Abbau der in dieser Arbeit eingesetzten kommerziellen Pektine auszumachen. So waren bei den eingesetzten Pektinen nach allen Fermentationszeiten überwiegend die gleichen freigesetzten Oligosaccharide identifizierbar. Dennoch waren die identifizierten Pektinoligosaccharide hilfreich für die Interpretation der weiteren *in vitro* und *in vivo* Fermentationsansätze.

Durch *in vitro* Fermentation mit humanen Fäzesproben über einen Zeitraum von 10 min bis 48 h konnte trotz der strukturellen Unterschiede für alle der neun untersuchten Pektine eine übergreifende Fermentationskinetik erarbeitet werden. Dabei wurde für alle Pektine bereits nach einer Fermentationszeit von 10 min ein schnell beginnender Abbau der Arabinane und Typ I (Arabino-)Galactane beobachtet. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer Studie von Gulfi und Mitarbeitenden (2017), bei welcher isolierte *hairy regions* eines Apfelppektins eingesetzt wurden und nach 1 h Fermentationszeit bereits 40 % der Struktur-einheiten abgebaut waren.

Eine Nachverfolgung des schnellen Arabinanabbaus über die Identifizierung arabinosehaltiger intermediär auftretender Spaltprodukte mittels HPAEC-PAD/MS war in der hier durchgeführten Arbeit jedoch nicht möglich. Eine potentielle Erklärung dafür ist eine schnelle Umsetzung der freigesetzten Arabinaneinheiten in ihre Fermentationsendprodukte, sodass die intermediären Spaltprodukte anders als bei den Typ I (Arabino-)Galactanen nicht nachweisbar sind. Daneben ist zu bedenken, dass beispielsweise für die Bakterienart *Bacteroides thetaiotaomicron*, welche im humanen Intestinaltrakt weit verbreitet ist, ein System mit mehreren *endo*- und *exo*-arabinanabbauenden Oberflächenenzymen identifiziert wurde (Turnbaugh *et al.* 2007; Luis *et al.* 2018). Die erzeugten Oligosaccharide werden bereits bei einem DP ≥ 6 über zwei Sus-like Transportsysteme in das Periplasma der Bakterien transportiert, wo sie weiter in ihre Monosaccharide abgebaut werden (Martens *et al.* 2011; Luis *et al.* 2018). Für Typ I (Arabino-)Galactane konnte bei dieser Bakterienart dahingegen lediglich ein Sus-like Transportsystem ausgemacht werden, welches ausschließlich durch kleine Galactooligosaccharide aktiviert wird (Luis *et al.* 2018). Daraus kann geschlossen werden, dass die Arabinaneinheiten im Vergleich zu den Typ I (Arabino-)Galactaneinheiten bereits als größere Struktureinheiten und, durch das Vorhandensein zweier Transportsysteme, schneller in den periplasmatischen Raum der Bakterien aufgenommen werden. Da höhermolekulare Arabinanstrukturen (DP > 7) mittels HPAEC-PAD/MS-basierter Analyse unter den angewandten Bedingungen nicht erfasst werden können, können eventuell freigesetzte höhermolekulare Arabinanligosaccharide nicht als intermediäre Spaltprodukte identifiziert werden. Um künftig zu überprüfen, ob höhermolekulare Arabinanligosaccharide zu früheren Zeitpunkten im Medium vorliegen, wäre eine Analyse der ethanollöslichen Verbindungen unter

Anwendung eines anderen chromatographischen Trennprinzips oder über eine Direktinjektion in eine MS ohne vorherige chromatographische Auftrennung möglich.

Der intensivste Abbau der Pektine war im Zuge der 48-stündigen *in vitro* Fermentationsstudie zwischen 10 min und 4 h zu beobachten und konnte primär auf einen Abbau der Homogalacturonane zurückgeführt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei einer *in vitro* Fermentationsstudie mit unterschiedlichen Citruspektinen erzielt, bei welcher zwischen 4 und 6 h Fermentationszeit hohe Konzentrationen an freigesetzten oligomeren Galacturonsäureeinheiten bestimmt wurden (Dongowski *et al.* 2000). Insgesamt war in der hier durchgeführten Arbeit bei den mittels HPAEC-PAD erzeugten Chromatogrammen nach 4 h Fermentationszeit bei fast allen untersuchten Pektinen das Signal der monomeren Galacturonsäure durch die größte Signalintensität geprägt. Eine mögliche Erklärung dafür kann wiederum über den Mechanismus des Homogalacturonanabbaus durch beispielsweise *Bacteroides thetaiotaomicron* gefunden werden. Homogalacturonane werden zunächst durch *endo*-Polysaccharidlyasen in ungesättigte Strukturen umgesetzt, aus welchen anschließend über eine *exo*-Glycosylhydrolase monomere gesättigte Galacturonsäureeinheiten freigesetzt werden können (Luis *et al.* 2018).

Eine langsamere Fermentation der Homogalacturonane im Vergleich zu den neutralen Seitenketten wurde bereits in der wissenschaftlichen Literatur vermutet (Gulfi *et al.* 2007; Rösch *et al.* 2017). Ein möglicher Grund hierfür könnte unter anderem die Sterik der Pektinstruktur darstellen. So wird vermutet, dass die bakterielle α -D-Galacturonidase, welche für die Freisetzung der monomeren Galacturonsäure verantwortlich ist, eine tunnelähnliche Struktur im katalytischen Apparat aufweist und so lediglich die Struktur linearer Homogalacturonane annimmt (Luis *et al.* 2018). So scheint eine Freisetzung oligomerer Homogalacturonanbruchstücke, welche frei von gebundenen Strukturen der Rhamnogalacturonane sind, als essentiell für die Aktivität des Enzyms. Daher handelt es sich beim Abbau der Homogalacturonane vermutlich um einen mehrstufigen Prozess. Der Nachweis teils höherer galacturonsäurehaltiger Oligosaccharide nach bereits 10 min Fermentationszeit zeugt dennoch für eine schnell beginnende Umsetzung der Homogalacturonane, welche sich angesichts des Nachweises der galacturonsäurehaltigen intermediären Spaltprodukte nach 4 h allerdings über einen längeren Zeitraum hinzieht.

Anhand der deutlich breiteren Molekulargewichtsverteilung von SBP nach 4 h *in vitro* Fermentationszeit kann zudem vermutet werden, dass SBP im Vergleich zu den restlichen Pektinen langsamer fermentiert wird. Die Analyse der glykosidischen Bindungstypen der nicht fermentierten Polysaccharide nach 10 min und 4 h Fermentation lässt einen Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Typ II (Arabino-)Galactanen in SBP vermuten. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit einer vorherigen Studie, bei welcher isolierte Strukturen der Typ II (Arabino-)Galactane deutlich langsamer umgesetzt wurden als die arabinanreichen Seitenketten von Apfelpektinen (Gulfi *et al.* 2007). Eine nähere Untersuchung der glykosidischen Bindungen wurde dabei allerdings nicht vorgenommen. Bei einer separaten Betrachtung der strukturellen

4. Ergebnisse und Diskussion

Einheiten der Typ II (Arabino-)Galactane konnte ein primärer Abbau der Seitenketten bei einem lediglich geringen Abbau des Rückgrats beobachtet werden. Dies kann vermutlich auf die makromolekulare Struktur der Typ II (Arabino-)Galactane zurückgeführt werden, welche als energetisch bevorzugte Konformation eine helicale Anordnung des 1,3-glykosidisch verknüpften Rückgrats aufweisen. Die Seitenketten organisieren sich dahingegen in einer linearen Anordnung weg vom Rückgrat (Pérez *et al.* 2000; Chandrasekaran und Janaswamy 2002). Durch diese Struktur sind die Seitenketten zugänglicher für die bakteriellen Enzyme. Gleichzeitig wird das Rückgrat durch die arabinose- und galactosehaltigen Seitenketten vor einem enzymatischen Abbau geschützt. Diese Hypothese steht im Gegensatz zu einer Studie von Cartmell und Mitarbeitenden (2018), in welcher die Metabolisierung von Typ II (Arabino-)Galactanen durch die Bakteriengattung *Bacteroides*, welche die Hauptorganismen für die Umsetzung dieser Struktureinheit umfasst, untersucht wurde. Dabei wurde zunächst ein Abbau des Rückgrats in *exo*-Manier unter Freisetzung und anschließendem Abbau der 1,6-verknüpften Seitenketten beobachtet. Als mögliche Erklärung dieser Unterschiede kann der Einsatz von Lärchen Arabinogalactanprotein ohne assoziierte Pektinstrukturen bei der Studie von Cartmell und Mitarbeitende (2018) herangezogen werden. Zusätzlich können strukturelle Varianzen zwischen Lärchen und Zuckerrüben Typ II (Arabino-)Galactanen Unterschiede in der Abbaubarkeit erklären.

Nach 24 und 48 h *in vitro* Fermentation konnte für alle Pektine auf eine nahezu vollständige Umsetzung der zugänglichen Pektinstrukturen geschlossen werden. So waren unter anderem in den ethanollöslichen Fraktionen der meisten Pektine keine intermediären Spaltprodukte mehr nachweisbar. Eine Ausnahme stellte dabei CP1 dar, bei welchem bei prolongierter Fermentationszeit weiterhin überwiegend monomere Galacturonsäure als Spaltprodukt bestimmt wurde. Insbesondere im Vergleich zu den anderen kommerziellen Citruspektinen war der verhältnismäßig hohe DM (66 %) für dieses Pektin eine strukturelle Auffälligkeit. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte bereits in wissenschaftlichen Studien mit Citruspektinen unterschiedlichen DMs ausgemacht werden, bei welchen ebenfalls mit zunehmendem DM eine langsamere Umsetzung der Pektine stattfand (Dongowski und Lorenz 1998; Dongowski *et al.* 2000). Konträr dazu steht eine Studie von Gulfi und Mitarbeitenden (2005), in welcher eine langsamere Metabolisierung von Pektinen mit niedrigem DM gezeigt werden konnte. Als mögliche Ursache für diese gegensätzlichen Ergebnisse können einerseits individuelle Unterschiede in der für die *in vitro* Fermentation eingesetzte Mikrobiota genannt werden. Andererseits konnte bereits gezeigt werden, dass die Methylester in Pektinen unterschiedlich angeordnet vorliegen können. So ist eine blockweise oder unregelmäßige Verteilung der Methylgruppen in den Homogalacturonanen möglich. Demnach treten auch große Unterschiede in der Häufigkeit und Länge der unmethylierten Bereiche auf (Ralet *et al.* 2012; Remoroza *et al.* 2014; Jermendi *et al.* 2022). Je nach Verteilung der Methylgruppen kann die Substratspezifität der bakteriellen Enzyme mehr oder weniger erfüllt sein und so der Abbau der Homogalacturonane

beeinflusst werden. Diese Hypothese ist auch eine mögliche Erklärung für die schnellere Fermentation der labortechnisch extrahierten Pektine, welche im Vergleich zu CP1 einen höheren DM aufweisen. Um jedoch eindeutige Rückschlüsse auf einen möglichen Zusammenhang ziehen zu können, wäre eine genauere Betrachtung der Methylgruppenverteilung notwendig.

Ebenfalls abweichend zu den Beobachtungen zum Fermentationsverhalten der anderen betrachteten Pektine waren bei SBP nach einer *in vitro* Fermentation von 24 und 48 h noch Struktureinheiten des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane identifizierbar. Neben intermediär auftretenden Spaltprodukten, welche lediglich aus Rhamnose und Galacturonsäure aufgebaut sind, konnten bei SBP bei prolongierten Fermentationszeiten zusätzlich Oligosaccharide der Typ I Rhamnogalacturonane mit glykosidisch verknüpften Arabinose- und Galactoseeinheiten nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass eine Metabolisierung des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane trotz teilweise unvollständigem Abbau der neutralen Seitenketten möglich ist. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse für SBP eine langsamere Metabolisierung des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane im Vergleich zu Homogalacturonanen. Neben dem Vorkommen von Typ II (Arabino-)Galactanen und einer möglicherweise dadurch bedingten langsameren Freisetzung von Untereinheiten der Typ I Rhamnogalacturonane kann dies zusätzlich durch das Vorkommen von Glucuronsäure bedingt sein. Diese wurde als Substituent von Galacturonsäure in Typ I Rhamnogalacturonanen von Zuckerrübenpektinen nachgewiesen (Renard *et al.* 1999). So ist eine Hinderung der *endo*-aktiven Enzyme zur Spaltung der Bindungen zwischen den Galacturonsäure- und den Rhamnoseeinheiten möglich. Eine Abspaltung der Glucuronsäure von der Galacturonsäureeinheit ist lediglich im periplasmatischen Bereich der Bakterien bekannt (Luis *et al.* 2018).

Anders als bei SBP kann bei den Citrus- und Apfelpektinen eine späte Fermentation (zwischen 24 und 48 h) des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane vermutet, aber nicht eindeutig belegt werden. Für eine langsamere Metabolisierung des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane spricht, dass es zwar einer Vielzahl der relevanten kolonialen Arten der *Bacteroides* möglich war, auf Homogalacturonanen und Typ I (Arabino-)Galactanen zu wachsen und diese demnach als Substrat und Energiequelle zu nutzen, jedoch nur ein geringer Anteil der untersuchten Bakterien das Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane verwerten konnte. Eine Umsetzung bereits freigesetzter Oligosaccharide war dahingegen möglich (Luis *et al.* 2018). So zeigt sich die initiale Freisetzung der Oligosaccharide je nach Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota vermutlich als geschwindigkeitsbestimmender Faktor bei der Umsetzung des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane.

Werden die Molekulargewichtsverteilungen der polymeren Rückstände nach einer Fermentationszeit von 48 h und die Monosaccharidzusammensetzung dieser Rückstände betrachtet, sind für alle Pektine fermentationsresistente bzw. langsam fermentierbare Strukturen auszumachen. Diese sind überwiegend durch Galacturonsäure und Rhamnose geprägt. Bei einer

4. Ergebnisse und Diskussion

zusätzlichen Betrachtung der Ergebnisse der gravimetrischen Bestimmung der nicht fermentierten Polymere kann der Anteil an fermentationsresistenten bzw. langsam fermentierbaren Strukturen allerdings als vergleichsweise gering angesehen werden.

Aus den Beobachtungen der *in vitro* Fermentation kann abgeleitet werden, dass zunächst die neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane und im Anschluss die Homogalacturonane der Pektine abgebaut werden. Zusätzlich lassen die Ergebnisse vermuten, dass das Rückgrat der Typ I Rhamnogalacturonane zuletzt abgebaut wird. Dies legt nahe, dass eine Fermentation der verschiedenen Struktureinheiten der Pektine in unterschiedlichen Abschnitten des Kolons erfolgt. Durch die Stimulierung unterschiedlicher Bakterien und die Produktion von SCFA in unterschiedlichen Anteilen kann die Fermentation der verschiedenen Struktureinheiten in unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Eigenschaften resultieren. Insgesamt ist bei der Interpretation der Ergebnisse nach *in vitro* Fermentation allerdings zu beachten, dass individuelle Unterschiede in der Mikrobiota einen starken Einfluss auf die Fermentation der Pektine haben können, was allein durch die zwei zeitlich unterschiedlichen Ansätze der *in vitro* Fermentation von CP2 widergespiegelt wird. Auch ist lediglich ein Bruchteil der im humanen Intestinaltrakt vertretenen Bakterien auch in den Fäzes enthalten (Zoetendal *et al.* 2002). Dementsprechend liefern solche Fermentationsansätze zwar Anhaltspunkte für das Verständnis der Pektin-fermentation, können allerdings nicht eindeutig auf einen lebenden Organismus übertragen werden. Daher wurden vier der strukturell unterschiedlichen Pektine *in vivo* in einem Mausmodell eingesetzt. Durch die Analyse der Fäzesproben war es möglich, eine weniger ausgeprägte Umsetzung der Pektine einhergehend mit einer höheren Pektinkonzentration im Futter zu beobachten. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen einer langsameren Pektin-fermentation und einem höheren DM der Pektine hergestellt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in einem Versuch mit Ratten nach Pektinsupplementierung beobachtet werden (Nyman und Asp 1982; Dongowski *et al.* 2002; Tian *et al.* 2016). So kann davon ausgegangen werden, dass in Mäusen geringe Mengen insbesondere niedrigmethylierter Pektine nahezu vollständig fermentiert werden. Bei höheren Anteilen und hochveresterten Pektinen im Futter wird vermutlich ein deutlicher Anteil unmetabolisiert wieder ausgeschieden und bietet somit, abgesehen von einem Bulkingeffekt, keinen ernährungsphysiologischen Mehrwert. Die in den Fäzes nachgewiesenen nicht fermentierten Struktureinheiten stammten dabei überwiegend aus den Homogalacturonanen. Diese Ergebnisse deuten, zumindest im murinen Modell, auf eine schnellere Umsetzung des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane im Vergleich zu den Homogalacturonanen hin. So ist es möglich, dass es sich bei der Beobachtung von SBP im *in vitro* Modell um eine pektinspezifische Besonderheit handelt. Da SBP in dem murinen *in vivo* Modell dieser Arbeit nicht eingesetzt wurde, konnte diese Vermutung nicht weiter überprüft werden.

Eine generelle Limitierung von *in vivo* Studien ist, dass lediglich die Fermentationsendprodukte der Pektine in den Fäzes betrachtet werden können, während der zeitabhängige Fermentationsverlauf der unterschiedlichen Struktureinheiten nicht untersucht werden kann. So können die Thesen der *in vitro* Fermentationsstudie zur Fermentationskinetik der Pektine in der Mausstudie (aber auch in der Humanstudie) ausschließlich über nicht fermentierte Pektinstruktureinheiten in den Fäzes überprüft werden. Zusätzlich sind die Ergebnisse des murinen Modells aufgrund der Unterschiede in der intestinalen Anatomie von Maus und Mensch lediglich Anhaltspunkte zur humanen Fermentation von Pektinen und nicht direkt auf den Menschen übertragbar (Casteleyn *et al.* 2010; Treuting und Dintzis 2012; Nguyen *et al.* 2015). In der daher durchgeführten Humanstudie wurde für einige Probandinnen und Probanden eine vermutlich vollständige Metabolisierung des eingesetzten Pektins ausgemacht. Gleichzeitig schieden 4 der 9 Probandinnen und Probanden polymere Pektine mit den Fäzes aus, was wiederum eine starke Individualität der kolonalen Mikrobiota und der davon abhängigen intestinalen Fermentation zeigt. Generell kann die vermehrte Aufnahme von (löslichen) Ballaststoffen die Transitzeit im humanen Kolon verändern und so den Kontakt der Pektine mit den bakteriellen Enzymen beeinflussen (Read 1986). Da auch diese Auswirkungen individuell unterschiedlich sind, wäre dies ein weiterer Erklärungsansatz für die variierende Widerfindung von Pektinen in den Fäzes. Strukturell setzten sich die nicht fermentierten Pektineinheiten in den humanen Fäzesproben wiederum überwiegend aus Strukturen der Homogalacturonane zusammen. Lediglich bei einer Probandin oder einem Probanden waren Struktureinheiten der Typ I Rhamnogalacturonane in den Fäzes nachweisbar. So kann eine langsamere Fermentation des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane *in vivo* nicht generell bestätigt werden. Da allerdings lediglich eines der neun initial untersuchten Pektine in dieser Studie eingesetzt wurde, können hier keine abschließenden Aussagen getroffen werden. So wäre ein Einsatz weiterer, strukturell diverser Pektine in einer Humanstudie für eine Bestätigung der Ergebnisse der *in vitro* Fermentation notwendig.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ballaststoffe stehen durch ihre positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften im Fokus einer gesundheitsbewussten Ernährung. Als wichtiger Bestandteil der Zellwände dikotyler Pflanzen stellen Pektine eine quantitativ relevante Quelle für Ballaststoffe dar. Dabei zeichnen sich Pektine durch strukturell diverse Struktureinheiten (unter anderem Homogalacturonane und Typ I Rhamnogalacturonane mit neutralen Seitenketten) aus und stellen somit komplexe Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand dar. Die für Pektine diskutierten ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften basieren unter anderem auf deren Fermentierbarkeit durch intestinale Bakterien im humanen Kolon. Bisherige Studien zur Pektinfermentation beschränken sich weitgehend auf die Betrachtung der kurzkettigen Fettsäuren (*Short-Chain Fatty Acids*) als Fermentationsendprodukte sowie den Einfluss der Fermentation auf die Zusammensetzung, Diversität und Quantität der Mikrobiota. Die Aufklärung von Zusammenhängen zwischen strukturellen Eigenschaften der Pektine und der Fermentationsgeschwindigkeit sowie die Identifizierung von fermentationsresistenten bzw. langsam fermentierten Struktureinheiten könnten dazu beitragen, die diskutierten ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften der Pektine in Bezug auf die Herkunft der Pektine und deren Einfluss auf die Fermentationsprozesse im Kolon einzuordnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher sechs kommerzielle und drei labortechnisch extrahierte, strukturell diverse Pektine aus Citrusschalen, Apfeltrester und Zuckerrübenschnitzeln hinsichtlich ihrer Struktur umfassend charakterisiert und anschließend in verschiedenen Fermentationsstudien eingesetzt. Nach *in vitro* Fermentation mit Enzymgemischen und humanen Fäzesproben über verschiedene Zeiten sowie *in vivo* Fermentation in Mäusen und Menschen wurden sowohl die nicht fermentierten Polysaccharide als auch Mono- und Oligosaccharide als (intermediäre) Spaltprodukte strukturell analysiert. So war es möglich, ein umfassendes Bild über die Fermentation der hier untersuchten Pektine und deren zeitlichen Verlauf zu erlangen.

Auf der Strukturebene zeigten sich zwischen den Pektinen unter anderem Unterschiede in den Anteilen und der Komplexität der neutralen Seitenketten der Typ I Rhamnogalacturonane. Dabei zeichneten sich die meisten kommerziellen Pektine durch vergleichsweise geringe Anteile an überwiegend linearen arabinosehaltigen neutralen Seitenketten aus. Das kommerzielle Zuckerrübenpektin wies jedoch ebenso wie die labortechnisch extrahierten Pektine einen höheren Anteil an komplexeren Arabinanen auf. Das Zuckerrübenpektin hob sich zudem durch das Vorkommen von Typ II (Arabino-)Galactanstruktureinheiten von den anderen Pektinen ab. Zusätzlich war es für alle Apfelpektine möglich, Xylogalacturonane nachzuweisen. Weitere strukturelle Unterschiede waren bezüglich des gewichtsgemittelten Molekulargewichts sowie des Methylierungs- und Acetylierungsgrads auszumachen. Während sich der Methylierungsgrad über einen weiten Bereich erstreckte (4,4 - 102,6 %), zeichneten sich die meisten Pektine durch einen

5. Zusammenfassung

geringen Acetylierungsgrad (0,2 - 2,9 %) aus. Ausnahmen stellten das labortechnisch hergestellte Apfelpektin und das kommerzielle Zuckerrübenpektin mit Acetylierungsgraden von 13,2 % bzw. 23,1 % dar.

Unter Einsatz verschiedener Enzymgemische in vereinfachten *in vitro* Fermentationsansätzen wiesen alle eingesetzten kommerziellen Pektine ähnliche Profile an freigesetzten Oligosacchariden auf. So war es anhand der Strukturcharakterisierung der Spaltprodukte nicht möglich, Unterschiede in der Fermentation der verschiedenen Pektine auszumachen. Dennoch dienten die identifizierten Fermentationsprodukte als Anhaltspunkte für die Interpretation der Ergebnisse der weiteren *in vitro* und *in vivo* Fermentationsansätze.

Die nach *in vitro* Fermentation mit humanen Fäzesproben gravimetrisch bestimmten, nicht fermentierten ethanolunlöslichen Polysaccharide ließen erste Rückschlüsse auf eine schnell beginnende Fermentation der Pektine nach bereits 10 min zu. Dies zeigte sich auch in deren Molekulargewichtsverteilungen. Der intensivste Abbau der Polysaccharide war bei allen untersuchten Pektinen im Fermentationszeitraum von 10 min bis 4 h zu beobachten. Zwischen 4 und 24 h wurden die noch verbliebenen polymeren Pektinstruktureinheiten nahezu vollständig umgesetzt. Die gravimetrische Bestimmung und die Molekulargewichtsverteilung der nicht fermentierten Polysaccharide zeigten daher lediglich geringe Unterschiede zwischen den Fermentationszeitpunkten 24 und 48 h an.

Die Analyse der Monomerzusammensetzung der nicht fermentierten Polysaccharide nach saurer Hydrolyse ermöglichte in Kombination mit der Strukturaufklärung der intermediären mono- und oligomeren Spaltprodukte eine Darstellung der Fermentationsabfolge der unterschiedlichen Pektinstruktureinheiten. Dabei war es erstmalig möglich, galactosehaltige Oligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer und massenspektrometrischer Detektion (HPAEC-PAD/MS) sowie Strukturen des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane über HPAEC-PAD/MS- sowie Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit hochauflösender zweidimensionaler Massenspektrometrie-basierter Analyse (UHPLC-HRMS²) als intermediäre Spaltprodukte der Pektine zu identifizieren. Insgesamt zeigte sich pektinübergreifend eine schnelle Metabolisierung der Arabinane und Typ I (Arabino-)Galactane als neutrale Seitenketten der Pektine. Die Fermentation der Homogalacturonane aller Pektine begann ebenfalls vergleichsweise schnell, erstreckte sich allerdings über einen längeren Zeitraum. Für das kommerzielle Zuckerrübenpektin war als einziges der untersuchten Pektine über die intermediären Spaltprodukte eine eindeutig langsamere Fermentation des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane nachzuweisen. Anhaltspunkte für ein ähnliches Fermentationsverhalten der weiteren untersuchten Pektine waren über die Monosaccharidzusammensetzungen der nicht fermentierten Polysaccharide zu beobachten, konnten allerdings nicht zweifelsfrei belegt werden.

Zwischen den untersuchten Pektinen waren bezüglich des dargestellten Fermentationsverlaufs lediglich geringe Unterschiede auszumachen. Eine Ausnahme stellte eines der kommerziellen Citruspektine dar, bei welchem eine langsamere Umsetzung der Homogalacturonane beobachtet wurde. Dies kann möglicherweise auf den hohen Methylierungsgrad des Pektins oder potentielle Unterschiede in der Verteilung der Methylgruppen im Pektin zurückgeführt werden. Zusätzlich wurde für das kommerzielle Zuckerrübenpektin eine insgesamt langsamere Fermentation im Vergleich zu den restlichen untersuchten Pektinen bestimmt, was vermutlich auf das Vorkommen von Typ II (Arabino-)Galactanen zurückzuführen ist. Auch nach 48 h Fermentationszeit waren für alle untersuchten Pektine weiterhin höhermolekulare Strukturen mit pektincharakteristischen Monosacchariden auszumachen, was auf weitgehend fermentationsresistente Strukturen in allen untersuchten Pektinen schließen lässt.

Durch den Einsatz von jeweils zwei der kommerziellen und labortechnisch hergestellten Pektine in einem Mausmodell wurden diese Erkenntnisse im lebenden Organismus überprüft. Dabei zeigte sich bei einer Fütterung von Pellets mit hohem Pektinanteil (15 %) eine Überschreitung der Fermentationskapazität im Kolon der Mäuse. Zusätzlich wurde eine langsamere Umsetzung höhermethylierter Pektine bestätigt, wobei lediglich geringe Unterschiede zwischen den kommerziellen und labortechnisch hergestellten Pektinen mit hohem Methylierungsgrad ausgemacht wurden. Die in den Mäusefäzes nachweisbaren Pektineinheiten setzten sich dabei überwiegend aus Strukturen der Homogalacturonane mit lediglich geringen Anteilen an Struktureinheiten der Typ I Rhamnogalacturonane zusammen.

Bei Einsatz des hochmethylierten, kommerziellen Apfelpektins in einer Humanstudie konnte bei 5 der 9 Probandinnen und Probanden auf eine vermutlich vollständige Metabolisierung der Pektinpolysaccharide in ihre Fermentationsendprodukte geschlossen werden. Bei den restlichen Probandinnen und Probanden war eine unvollständige Fermentation zu beobachten. Die nicht fermentierten Pektineinheiten setzten sich überwiegend aus Strukturen der Homogalacturonane zusammen, wobei eine Probandin oder ein Proband vermutlich auch polymere Bestandteile der neutralen Seitenketten und des Rückgrats der Typ I Rhamnogalacturonane unmetabolisiert ausgeschieden hat. So konnte die ausgeprägte Individualität der humanen intestinalen Fermentation von Pektinen hervorgehoben werden.

In Summe legen die Daten der verschiedenen Fermentationsansätze eine unterschiedlich schnelle Metabolisierung der verschiedenen Struktureinheiten der Pektine nahe. Dabei scheint die individuelle Struktur der Pektine einen geringeren Einfluss auf die Fermentationsreihenfolge zu haben. Die Unterschiede in der Fermentationsgeschwindigkeit legen eine Metabolisierung der verschiedenen Pektinpolymere in unterschiedlichen Abschnitten des Kolons nahe.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adetunji, L. R., Adekunle, A., Orsat, V., Raghavan, V. (2017): Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: a review. *Food Hydrocolloids*. 62: 239-250.
- Aguirre, M., Eck, A., Koenen, M. E., Savelkoul, P. H. M., Budding, A. E., Venema, K. (2016): Diet drives quick changes in the metabolic activity and composition of human gut microbiota in a validated *in vitro* gut model. *Research in Microbiology*. 167 (2): 114-125.
- Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D., Karr, A. (1967): A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*. 5 (3): 340-345.
- Allerdings, E., Ralph, J., Steinhart, H., Bunzel, M. (2006): Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry*. 67 (12): 1276-1286.
- Al-Tamimi, M. A. H. M., Palframan, R. J., Cooper, J. M., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2006): *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology*. 100 (2): 407-414.
- An, J., O'Neill, M. A., Albersheim, P., Darvill, A. G. (1994): Isolation and structural characterization of β -D-glucosyluronic acid and 4-O-methyl β -D-glucosyluronic acid-containing oligosaccharides from the cell-wall pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research*. 252: 235-243.
- Anderson, D., McDougall, F. J., McNab, C. (1987): Differences between the amino acid compositions of apple and various citrus pectins. *Food Hydrocolloids*. 1 (3): 243-246.
- Anthon, G. E., Barrett, D. M. (2008): Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin: application to tomato products. *Food Chemistry*. 110 (1): 239-247.
- Aspinall, G. O., Begbie, R., Hamilton, A., Whyte, J. N. (1967): Polysaccharides of soy-beans. 3. Extraction and fractionation of polysaccharides from cotyledon meal. *Journal of the Chemical Society*. 11 (0): 1065-1070.
- Babbar, N., Dejonghe, W., Sforza, S., Elst, K. (2017): Enzymatic pectic oligosaccharides (POS) production from sugar beet pulp using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*. 54 (11): 3707-3715.
- Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A., Mohtashamy, M. (2011): Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from

6. Literaturverzeichnis

- grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 50 (11-12): 1237-1243.
- Baumann, A., Pfeifer, L., Classen, B. (2021): Arabinogalactan-proteins from non-coniferous gymnosperms have unusual structural features. *Carbohydrate Polymers*. 261: 117831.
- Bédouet, L., Courtois, B., Courtois, J. (2003): Rapid quantification of O-acetyl and O-methyl residues in pectin extracts. *Carbohydrate Research*. 338 (4): 379-383.
- Bindereif, B., Eichhöfer, H., Bunzel, M., Karbstein, H. P., Wefers, D., van der Schaaf, U. S. (2021): Arabinan side-chains strongly affect the emulsifying properties of acid-extracted sugar beet pectins. *Food Hydrocolloids*. 121: 106968.
- Bitter, T., Muir, H. M. (1962): A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*. 4 (4): 330-334.
- Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J., Stone, B. A. (1983): A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*. 113 (2): 291-299.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*. 54 (2): 484-489.
- BMEL (2022a): Statistisches Bundesamt - Erntemenge von Zuckerrüben in der Europäischen Union nach Ländern in den Jahren 2019 bis 2021, zuletzt geprüft am 17.08.2022.
- BMEL (2022b): Statistisches Bundesamt - Produktionsmenge von Apfelsaft in Deutschland in den Jahren 2004 bis 2021 (in Millionen Litern), zuletzt geprüft am 17.08.2022.
- BMEL (2022c): Statistisches Bundesamt - Produktionsmenge von Orangensaft in Deutschland in den Jahren 2004 bis 2021 (in Millionen Litern), zuletzt geprüft am 17.08.2022.
- Bradstreet, R. B. (1954): Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*. 26 (1): 185-187.
- Branca, C., Lorenzo, G. de, Cervone, F. (1988): Competitive inhibition of the auxin-induced elongation by α -D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Physiologia Plantarum*. 72 (3): 499-504.
- Brown, J. A., Fry, S. C. (1993): The preparation and susceptibility to hydrolysis of novel O-galacturonoyl derivatives of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 240: 95-106.
- Buffetto, F., Cornuault, V., Rydahl, M. G., Ropartz, D., Alvarado, C., Echasserieau, V. et al. (2015): The deconstruction of pectic rhamnogalacturonan I unmasks the occurrence of a novel arabinogalactan oligosaccharide epitope. *Plant and Cell Physiology*. 56 (11): 2181-2196.
- Bunzel, M., Ralph, J., Steinhart, H. (2005): Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49 (6): 551-559.

- Burkitt, D., Walker, A., Painter, N. (1972): Effect of dietary fibre on stools and transit-times, and its role in the causation of disease. *The Lancet*. 300 (7792): 1408-1411.
- Cabib, E., Roberts, R., Bowers, B. (1982): Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 51 (1): 763-793.
- Caffall, K. H., Mohnen, D. (2009): The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 344 (14): 1879-1900.
- Capek, P., Toman, R., Kardošová, A., Rosík, J. (1983): Polysaccharides from the roots of the marsh mallow (*Althaea officinalis* L.): structure of an arabinan. *Carbohydrate Research*. 117: 133-140.
- Cardoso, S. M., Silva, A. M., Coimbra, M. A. (2002): Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. *Carbohydrate Research*. 337 (10): 917-924.
- Carpita, N. C., Gibeaut, D. M. (1993): Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. 3 (1): 1-30.
- Cartmell, A., Muñoz-Muñoz, J., Briggs, J. A., Ndeh, D. A., Lowe, E. C., Baslé, A. *et al.* (2018): A surface endogalactanase in *Bacteroides thetaiotaomicron* confers keystone status for arabinogalactan degradation. *Nature Microbiology*. 3 (11): 1314-1326.
- Casteleyn, C., Rekecki, A., van der Aa, A., Simoens, P., van den Broeck, W. (2010): Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Laboratory Animals*. 44 (3): 176-183.
- CCRC (2007): Complex Carbohydrate Research Center, The CCRC spectral database for PMAA's. University of Georgia. Athens, GA,USA.
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J., Loh, X. J. (2017): Pectin as a rheology modifier: origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*. 161: 118-139.
- Chandrasekaran, R., Janaswamy, S. (2002): Morphology of western larch arabinogalactan. *Carbohydrate Research*. 337 (21-23): 2211-2222.
- Chapot-Chartier, M.-P., Kulakauskas, S. (2014): Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 13 Suppl 1: S9.
- Chau, C.-F., Huang, Y.-L. (2003): Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (9): 2615-2618.
- Chen, J., Liang, R., Liu, W., Li, T., Liu, C., Wu, S., Wang, Z. (2013): Pectic-oligosaccharides prepared by dynamic high-pressure microfluidization and their *in vitro* fermentation properties. *Carbohydrate Polymers*. 91 (1): 175-182.

6. Literaturverzeichnis

- Chung, W. S. F., Meijerink, M., Zeuner, B., Holck, J., Louis, P., Meyer, A. S. *et al.* (2017): Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS Microbiology Ecology*. 93 (11).
- Churms, S. C. (1996): Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. *Journal of Chromatography A*. 720 (1-2): 151-166.
- Ciucanu, I., Kerek, F. (1984): A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. 131 (2): 209-217.
- Clarke, A. E., Anderson, R. L., Stone, B. A. (1979): Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*. 18 (4): 521-540.
- Coenen, G. J., Bakx, E. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A., Voragen, A. (2007): Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers*. 70 (2): 224-235.
- Cole, R. B. (2000): Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 35: 763-772.
- Colquhoun, I. J., Ruiters, G. A. de, Schols, H. A., Voragen, A. G. (1990): Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research*. 206 (1): 131-144.
- Combo, A. M. M., Aguedo, M., Goffin, D., Wathelet, B., Paquot, M. (2012): Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioproducts Processing*. 90 (3): 588-596.
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., Macfarlane, G. T. (1987): Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 28 (10): 1221-1227.
- Daher, F. B., Braybrook, S. A. (2015): How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Frontiers in Plant Science*. 6: 523.
- Das, N. N., Das, S. C., Dutt, A. S., Roy, A. (1981): Lignin-xylan ester linkage in jute fiber (*Corchorus capsularis*). *Carbohydrate Research*. 94 (1): 73-82.
- Davis, K. R., Darvill, A. G., Albersheim, P., Dell, A. (1986): Host-pathogen interactions : XXIX. oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. *Plant Physiology*. 80 (2): 568-577.
- Davison, P. K., Young, R. (1969): Gas chromatography of carbohydrates the quantitative determination of the free sugars of plants as their trimethylsilyl ethers. *Journal of Chromatography A*. 41: 12-21.

- De Ruiter, G. A., Schols, H. A., Voragen, A. G., Rombouts, F. M. (1992): Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry*. 207 (1): 176-185.
- De Vries, J. A., Rombouts, F. M., Voragen, A., Pilnik, W. (1982): Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers*. 2 (1): 25-33.
- Dea, I., Madden, J. K. (1986): Acetylated pectic polysaccharides of sugar beet. *Food Hydrocolloids*. 1 (1): 71-88.
- Denman, L. J., Morris, G. A. (2015): An experimental design approach to the chemical characterisation of pectin polysaccharides extracted from *Cucumis melo* Inodorus. *Carbohydrate Polymers*. 117: 364-369.
- Despres, J., Forano, E., Lepercq, P., Comtet-Marre, S., Jubelin, G., Chambon, C. *et al.* (2016a): Xylan degradation by the human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1A(T) involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level. *BMC Genomics*. 17: 326.
- Despres, J., Forano, E., Lepercq, P., Comtet-Marre, S., Jubelin, G., Yeoman, C. J. *et al.* (2016b): Unraveling the pectinolytic function of *Bacteroides xylanisolvens* using a RNA-seq approach and mutagenesis. *BMC Genomics*. 17: 147.
- DGE (2016): Vollwertig essen und trinken nach den 10 Regeln der DGE. Online verfügbar unter <https://www.dge.de/ernaehrungspraxis/vollwertige-ernaehrung/10-regeln-der-dge/>, zuletzt geprüft am 07.11.2022.
- DGE (2021): D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Bonn: Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE); Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE).
- Dische, Z. (1947): A new apecific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry*. 167 (1): 189-198.
- Dobberstein, D., Bunzel, M. (2010): Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (16): 8927-8935.
- Domon, B., Costello, C. E. (1988): A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*. 5 (4): 397-409.
- Dongowski, G., Lorenz, A. (1998): Unsaturated oligogalacturonic acids are generated by *in vitro* treatment of pectin with human faecal flora. *Carbohydrate Research*. 314 (3-4): 237-244.

6. Literaturverzeichnis

- Dongowski, G., Lorenz, A., Anger, H. (2000): Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from human gut flora. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (4): 1321-1327.
- Dongowski, G., Lorenz, A., Proll, J. (2002): The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and *in vitro*. *The Journal of Nutrition*. 132 (7): 1935-1944.
- Dourado, F., Cardoso, S., Silva, A., Gama, F., Coimbra, M. (2006): NMR structural elucidation of the arabinan from *Prunus dulcis* immunobiological active pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 66 (1): 27-33.
- Duncan, S. H., Barcenilla, A., Stewart, C. S., Pryde, S. E., Flint, H. J. (2002): Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (10): 5186-5190.
- Ebringerová, A. (2005): Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*. 232 (1): 1-12.
- Ebringerová, A., Heinze, T. (2000): Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*. 21 (9): 542-556.
- EFSA (2010): Scientific opinion on the substantiation of health claims related to pectins and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 786), maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 818) and increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 4692) pursuant to article 13(1) of regulation (EC) no 1924/2006. *EFSA Journal*. 8 (10): 1747.
- Eichhöfer, H., Bindereif, B., Karbstein, H. P., Bunzel, M., van der Schaaf, U. S., Wefers, D. (2023): Influence of arabinan fine structure, galacturonan backbone length, and degree of esterification on the emulsifying properties of acid-extracted sugar beet pectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 71 (4): 2105-2112.
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., Henrissat, B. (2013): The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 11 (7): 497-504.
- El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J. (2009): Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*. 44 (3): 210-230.
- Enck, P., Merlin, V., Erckenbrecht, J. F., Wienbeck, M. (1989): Stress effects on gastrointestinal transit in the rat. *Gut*. 30 (4): 455-459.
- Evans, J. D., Akin, D. E., Foulk, J. A. (2002): Flax-retting by polygalacturonase-containing enzyme mixtures and effects on fiber properties. *Journal of Biotechnology*. 97 (3): 223-231.

- Ferreira-Lazarte, A., Kachrimanidou, V., Villamiel, M., Rastall, R. A., Moreno, F. J. (2018): *In vitro* fermentation properties of pectins and enzymatic-modified pectins obtained from different renewable bioresources. *Carbohydrate Polymers*. 199: 482-491.
- Food Chemical Codex (1972): National academy of science. 2. Aufl. Washington, DC.
- Frese, S. A., Mackenzie, D. A., Peterson, D. A., Schmaltz, R., Fangman, T., Zhou, Y. *et al.* (2013): Molecular characterization of host-specific biofilm formation in a vertebrate gut symbiont. *PLOS Genetics*. 9 (12): e1004057.
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L. *et al.* (2014): The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*. 5 (1): 3611.
- Fry, S. C. (1983): Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta*. 157 (2): 111-123.
- Fry, S. C. (1989): The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany*. 40 (1): 1-11.
- Funami, T., Zhang, G., Hiroe, M., Noda, S., Nakauma, M., Asai, I. *et al.* (2007): Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*. 21 (8): 1319-1329.
- Garna, H., Mabon, N., Nott, K., Wathelet, B., Paquot, M. (2006): Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry*. 96 (3): 477-484.
- Gaspar, Y., Johnson, K. L., McKenna, J. A., Bacic, A., Schultz, C. J. (2001): The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*. 47 (1/2): 161-176.
- Gaul, H. (2020): Untersuchung des Fermentationsverlaufs von Pektin und seinen Struktureinheiten. Masterarbeit. Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie.
- Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., Schols, H., Alonso, J. L. (2016): Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: a comparative evaluation. *Journal of Functional Foods*. 20: 108-121.
- Grondin, J. M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D. W., Brumer, H. (2017): Polysaccharide utilization loci: fueling microbial communities. *Journal of Bacteriology*. 199 (15).
- Guillon, F., Thibault, J.-F. (1989): Methylation analysis and mild acid hydrolysis of the "hairy" fragments of sugar-beet pectins. *Carbohydrate Research*. 190 (1): 85-96.

6. Literaturverzeichnis

- Gulfi, M., Arrigoni, E., Amado, R. (2005): Influence of structure on in vitro fermentability of commercial pectins and partially hydrolysed pectin preparations. *Carbohydrate Polymers*. 59 (2): 247-255.
- Gulfi, M., Arrigoni, E., Amadò, R. (2007): *In vitro* fermentability of a pectin fraction rich in hairy regions. *Carbohydrate Polymers*. 67 (3): 410-416.
- Guo, X., Zhang, T., Meng, H., Yu, S. (2017): Ethanol precipitation of sugar beet pectins as affected by electrostatic interactions between counter ions and pectin chains. *Food Hydrocolloids*. 65: 187-197.
- Hakomori, S.-I. (1964): A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *The Journal of Biochemistry*. 55 (2): 205-208.
- Harris, P. J., Smith, B. G. (2006): Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology*. 41 (s2): 129-143.
- Hartley, R. D., Harris, P. J. (1981): Phenolic constituents of the cell walls of dicotyledons. *Biochemical Systematics and Ecology*. 9 (2-3): 189-203.
- Hatzakis, E. (2019): Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in food science: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18 (1): 189-220.
- Hemström, P., Irgum, K. (2006): Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*. 29 (12): 1784-1821.
- Hicks, K. B., Sondey, S. M. (1987): Preparative high-performance liquid chromatography of malto-oligosaccharides. *Journal of Chromatography A*. 389: 189-194.
- Hinz, S. W. A., Verhoef, R., Schols, H. A., Vincken, J.-P., Voragen, A. G. J. (2005): Type I arabinogalactan contains β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp structural elements. *Carbohydrate Research*. 340 (13): 2135-2143.
- Holck, J., Lorentzen, A., Vignsnaes, L. K., Licht, T. R., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S. (2011): Feruloylated and nonferuloylated arabino-oligosaccharides from sugar beet pectin selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. in human fecal *in vitro* fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (12): 6511-6519.
- Holt, S., Carter, D., Tothill, P., Heading, R., Prescott, L. (1979): Effect of gel fibre on gastric emptying and absorption of glucose and paracetamol. *The Lancet*. 313 (8117): 636-639.
- Hotchkiss, A. T., Olano-Martin, E., Grace, W. E., Gibson, G. R., Rastall, R. A.: Pectic oligosaccharides as prebiotics. *Oligosaccharides in Food and Agriculture* (5): 54-62.

- Huang, X., Li, D., Wang, L. (2018): Effect of particle size of sugar beet pulp on the extraction and property of pectin. *Journal of Food Engineering*. 218: 44-49.
- Huch, M., Stoll, D. A., Kulling, S. E., Soukup, S. T. (2022): Metabolism of glyphosate by the human fecal microbiota. *Toxicology Letters*. 358: 1-5.
- Hugenholtz, F., Vos, W. M. de (2018): Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75 (1): 149-160.
- Huisman, M. M., Brüll, L. P., Thomas-Oates, J. E., Haverkamp, J., Schols, H. A., Voragen, A. G. (2001): The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research*. 330 (1): 103-114.
- Immerzeel, P., Eppink, M. M., Vries, S. C. de, Schols, H. A., Voragen, A. G. J. (2006): Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiologia Plantarum*. 128 (1): 18-28.
- Ishii, T. (1994): Feruloyl oligosaccharides from cell walls of suspension-cultured spinach cells and sugar beet pulp. *Plant and Cell Physiology*. 35 (4): 701-704.
- Ishii, T. (1995): Isolation and characterization of acetylated rhamnogalacturonan oligomers liberated from bamboo shoot cell-walls by driselase. *Journal of the Japan Wood Research Society*. 41 (6).
- Ishii, T. (1997): O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiology*. 113 (4): 1265-1272.
- Ishii, T., Matsunaga, T. (2001): Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*. 57 (6): 969-974.
- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M. A., Darvill, A., Albersheim, P. (1999): The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (19): 13098-13104.
- Jenkins, D. J. A., Newton, C., Leeds, A., Cummings, J. (1975): Effect of pectin, guar gum, and wheat fibre on serum-cholesterol. *The Lancet*. 305 (7916): 1116-1117.
- Jensen, N. S., Canale-Parola, E. (1985): Nutritionally limited pectinolytic bacteria from the human intestine. *Applied and Environmental Microbiology*. 50 (1): 172-173.
- Jermendi, É., Beukema, M., van den Berg, M. A., Vos, P. de, Schols, H. A. (2022): Revealing methyl-esterification patterns of pectins by enzymatic fingerprinting: beyond the degree of blockiness. *Carbohydrate Polymers*. 277: 118813.

6. Literaturverzeichnis

- Jung, S., Rickert, D. A., Deak, N. A., Aldin, E. D., Recknor, J., Johnson, L. A., Murphy, P. A. (2003): Comparison of kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 80 (12): 1169.
- Junker, F., Michalski, K., Guthausen, G., Bunzel, M. (2021): Characterization of covalent, feruloylated polysaccharide gels by pulsed field gradient-stimulated echo (PFG-STE)-NMR. *Carbohydrate Polymers*. 267: 118232.
- Kaczmarek, J. L., Musaad, S. M., Holscher, H. D. (2017): Time of day and eating behaviors are associated with the composition and function of the human gastrointestinal microbiota. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 106 (5): 1220-1231.
- Kaczmarska, A., Pieczywek, P. M., Cybulska, J., Zdunek, A. (2022): Structure and functionality of rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: a review. *Carbohydrate Polymers*. 278: 118909.
- Kang, X., Kirui, A., Dickwella Widanage, M. C., Mentink-Vigier, F., Cosgrove, D. J., Wang, T. (2019): Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*. 10 (1): 347.
- Kapoor, V. P., Taravel, F. R., Joseleau, J.-P., Milas, M., Chanzy, H., Rinaudo, M. (1998): *Cassia spectabilis* DC seed galactomannan: structural, crystallographical and rheological studies. *Carbohydrate Research*. 306 (1-2): 231-241.
- Kar, F., Arslan, N. (1999): Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*. 40 (4): 277-284.
- Khodaei, N., Karboune, S. (2016): Enzymatic generation of galactose-rich oligosaccharides/oligomers from potato rhamnogalacturonan I pectic polysaccharides. *Food Chemistry*. 197 (Pt A): 406-414.
- Kiefer, L. L., York, W. S., Darvill, A. G., Albersheim, P. (1989): Xyloglucan isolated from suspension-cultured sycamore cell walls is O-acetylated. *Phytochemistry*. 28 (8): 2105-2107.
- Kim, C. C., Healey, G. R., Kelly, W. J., Patchett, M. L., Jordens, Z., Tannock, G. W. *et al.* (2019): Genomic insights from *Monoglobus pectinilyticus*: a pectin-degrading specialist bacterium in the human colon. *The ISME Journal*. 13 (6): 1437-1456.
- Kim, J. B., Carpita, N. C. (1992): Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiology*. 98 (2): 646-653.
- Kintner, P. K., Buren, J. P. (1982): Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the *m*-hydroxydiphenyl method. *Journal of Food Science*. 47 (3): 756-759.

- Kjeldahl, J. (1883): Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*. 22 (1): 366-382.
- Koh, A., Vadder, F. de, Kovatcheva-Datchary, P., Bäckhed, F. (2016): From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*. 165 (6): 1332-1345.
- Kravtchenko, T. P., Arnould, I., Voragen, A., Pilnik, W. (1992a): Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical β -elimination in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 19 (4): 237-242.
- Kravtchenko, T. P., Voragen, A., Pilnik, W. (1992b): Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carbohydrate Polymers*. 18 (1): 17-25.
- Kristensen, M., Jensen, M. G. (2011): Dietary fibres in the regulation of appetite and food intake. Importance of viscosity. *Appetite*. 56 (1): 65-70.
- Kulkarni, S. G., Vijayanand, P. (2010): Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa* L.). *LWT - Food Science and Technology*. 43 (7): 1026-1031.
- Laine, C., Tamminen, T., Vikkula, A., Vuorinen, T. (2002): Methylation analysis as a tool for structural analysis of wood polysaccharides. *Holzforschung*. 56 (6): 607-614.
- Larsen, J. M. (2017): The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*. 151 (4): 363-374.
- Larsen, N., Bussolo de Souza, C., Krych, L., Barbosa Cahú, T., Wiese, M., Kot, W. *et al.* (2019): Potential of pectins to beneficially modulate the gut microbiota depends on their structural properties. *Frontiers in Microbiology*. 10: 223.
- Le Goff, A., Renard, C., Bonnin, E., Thibault, J.-F. (2001): Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers*. 45 (4): 325-334.
- Lee, Y. (1996): Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 720 (1-2): 137-149.
- Lee, Y. C. (1990): High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Analytical Biochemistry*. 189 (2): 151-162.
- Leijdekkers, A. G. M., Aguirre, M., Venema, K., Bosch, G., Gruppen, H., Schols, H. A. (2014): *In vitro* fermentability of sugar beet pulp derived oligosaccharides using human and pig fecal inocula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 (5): 1079-1087.
- Leijdekkers, A. G. M., Bink, J. P. M., Geutjes, S., Schols, H. A., Gruppen, H. (2013): Enzymatic saccharification of sugar beet pulp for the production of galacturonic acid and arabinose;

6. Literaturverzeichnis

- a study on the impact of the formation of recalcitrant oligosaccharides. *Bioresource Technology*. 128: 518-525.
- Lerouge, P., O'Neill, M. A., Davill, A. G., Albersheim, P. (1993): Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research*. 243 (2): 359-371.
- Levigne, S., Ralet, M.-C., Quéméner, B., Thibault, J.-F. (2004a): Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls. *Carbohydrate Research*. 339 (13): 2315-2319.
- Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M.-C., Quemener, B., Thibault, J.-F. (2002): Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids*. 16 (6): 547-550.
- Levigne, S. V., Ralet, M.-C. J., Quéméner, B. C., Pollet, B. N.-L., Lapierre, C., Thibault, J.-F. J. (2004b): Isolation from sugar beet cell walls of arabinan oligosaccharides esterified by two ferulic acid monomers. *Plant Physiology*. 134 (3): 1173-1180.
- Louis, P., Duncan, S. H., McCrae, S. I., Millar, J., Jackson, M. S., Flint, H. J. (2004): Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of Bacteriology*. 186 (7): 2099-2106.
- Louis, P., Flint, H. J. (2017): Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*. 19 (1): 29-41.
- Lu, S., Flanagan, B. M., Mikkelsen, D., Williams, B. A., Gidley, M. J. (2022): *In vitro* fermentation of onion cell walls and model polysaccharides using human faecal inoculum: effects of molecular interactions and cell wall architecture. *Food Hydrocolloids*. 124: 107257.
- Luis, A. S., Briggs, J., Zhang, X., Farnell, B., Ndeh, D., Labourel, A. *et al.* (2018): Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic *Bacteroides*. *Nature Microbiology*. 3 (2): 210-219.
- Luzio, G. A., Cameron, R. G. (2013): Determination of degree of methylation of food pectins by chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93 (10): 2463-2469.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G. T. (2003): Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62 (1): 67-72.
- Mariotti, F., Tomé, D., Mirand, P. P. (2008): Converting nitrogen into protein - beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 (2): 177-184.
- Martens, D. A., Frankenberger, W. T. (1992): Pulsed amperometric detection of amino acids separated by anion exchange chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 15 (3): 423-439.

- Martens, E. C., Lowe, E. C., Chiang, H., Pudlo, N. A., Wu, M., McNulty, N. P. *et al.* (2011): Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biology*. 9 (12): e1001221.
- May, C. D. (1990): Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*. 12 (1): 79-99.
- McCarthy, R. E., Kotarski, S. F., Salyers, A. A. (1985): Location and characteristics of enzymes involved in the breakdown of polygalacturonic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*. 161 (2): 493-499.
- McDougall, G. J., Morrison, I. M., Stewart, D., Hillman, J. R. (1996): Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 70 (2): 133-150.
- McKenzie, L. R., Young, P. N. (1975): Determination of ammonia-, nitrate- and organic nitrogen in water and waste water with an ammonia gas-sensing electrode. *The Analyst*. 100 (1194): 620-628.
- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., Albersheim, P. (1984): Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*. 53 (1): 625-663.
- Melton, L. D., Smith, B. G. (2001): Determination of neutral sugars by gas chromatography of their alditol acetates. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 00 (1).
- Mester, Z., Sturgeon, R., Pawliszyn, J. (2001): Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 56 (3): 233-260.
- Micard, V., Grabber, J. H., Ralph, J., Renard, C., Thibault, J.-F. (1997): Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp. *Phytochemistry*. 44 (7): 1365-1368.
- Mohnen, D. (2008): Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 11 (3): 266-277.
- Moreira, L. R. S., Filho, E. X. F. (2008): An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79 (2): 165-178.
- Müller-Maatsch, J., Caligiani, A., Tedeschi, T., Elst, K., Sforza, S. (2014): Simple and validated quantitative ¹H NMR method for the determination of methylation, acetylation, and feruloylation degree of pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 (37): 9081-9087.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Tanabe, M., Matsubara, K., Matsuura, Y. (1999): Degradation of pectic substances by two pectate lyases from a human intestinal bacterium, *Clostridium butyricum-beijerinckii* group. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88 (3): 331-333.

6. Literaturverzeichnis

- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T., Nagamatsu, Y. (2002a): Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66 (5): 1155-1158.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T., Nagamatsu, Y. (2002b): Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66 (6): 1301-1313.
- Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A. S., Baslé, A., Gray, J. *et al.* (2017): Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*. 544 (7648): 65-70.
- Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J. (2015): How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*. 8 (1): 1-16.
- Nogal, A., Valdes, A. M., Menni, C. (2021): The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. *Gut Microbes*. 13 (1): 1-24.
- Noguchi, M., Hasegawa, Y., Suzuki, S., Nakazawa, M., Ueda, M., Sakamoto, T. (2020): Determination of chemical structure of pea pectin by using pectinolytic enzymes. *Carbohydrate Polymers*. 231: 115738.
- Nyman, M., Asp, N. G. (1982): Fermentation of dietary fibre components in the rat intestinal tract. *The British Journal of Nutrition*. 47 (3): 357-366.
- O'Shea, N., Ktenioudaki, A., Smyth, T. P., McLoughlin, P., Doran, L., Auty, M. *et al.* (2015): Physicochemical assessment of two fruit by-products as functional ingredients: apple and orange pomace. *Journal of Food Engineering*. 153: 89-95.
- Øbro, J., Harholt, J., Scheller, H. V., Orfila, C. (2004): Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry*. 65 (10): 1429-1438.
- Ognyanov, M., Remoroza, C., Schols, H. A., Georgiev, Y., Kratchanova, M., Kratchanov, C. (2016): Isolation and structure elucidation of pectic polysaccharide from rose hip fruits (*Rosa canina* L.). *Carbohydrate Polymers*. 151: 803-811.
- Olano-Martin, E., Gibson, G. R., Rastell, R. A. (2002): Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 93 (3): 505-511.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A. G. (2004): Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 109-139.

- Onumpai, C., Kolida, S., Bonnin, E., Rastall, R. A. (2011): Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (16): 5747-5754.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Voragen, A. G. (2000): Oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*. 328 (2): 199-207.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Voragen, A. G. (2002): Enzymatic modification of pectic polysaccharides obtained from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers*. 48 (1): 73-81.
- O'Sullivan, A. C. (1997): Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*. 4 (3): 173-207.
- Pagán, J., Ibarz, A. (1999): Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. *Journal of Food Engineering*. 39 (2): 193-201.
- Paskach, T. J., Lieker, H.-P., Reilly, P. J., Thielecke, K. (1991): High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions. *Carbohydrate Research*. 215 (1): 1-14.
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., York, W. S. (1999): Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*. 20 (6): 629-639.
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J.-M. (1995): Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*. 277 (1): 135-143.
- Pérez, S., Mazeau, K., Du Hervé Penhoat, C. (2000): The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38 (1-2): 37-55.
- Perrone, P., Hewage, C. M., Thomson, A. R., Bailey, K., Sadler, I. H., Fry, S. C. (2002): Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins. *Phytochemistry*. 60 (1): 67-77.
- Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B., Bacic, A. (2012): Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols*. 7 (9): 1590-1607.
- Pianta, A., Arvikar, S., Strle, K., Drouin, E. E., Wang, Q., Costello, C. E., Steere, A. C. (2017): Evidence of the immune relevance of *Prevotella copri*, a gut microbe, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 69 (5): 964-975.
- Pippen, E. L., McCready, R. M., Owens, H. S. (1950): Gelation properties of partially acetylated pectins. *Journal of the American Chemical Society*. 72 (2): 813-816.
- Preiss, J., Ashwell, G. (1963): Polygalacturonic acid metabolism in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 238 (5): 1571-1576.

6. Literaturverzeichnis

- Ragsdale, S. W., Pierce, E. (2008): Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1784 (12): 1873-1898.
- Ralet, M.-C., André-Leroux, G., Quéméner, B., Thibault, J. F. (2005a): Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. *Phytochemistry*. 66 (24): 2800-2814.
- Ralet, M.-C., Cabrera, J. C., Bonnin, E., Quéméner, B., Hellin, P., Thibault, J.-F. (2005b): Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*. 66 (15): 1832-1843.
- Ralet, M.-C., Lerouge, P., Quéméner, B. (2009): Mass spectrometry for pectin structure analysis. *Carbohydrate Research*. 344 (14): 1798-1807.
- Ralet, M.-C., Williams, M. A. K., Tanhatan-Nasseri, A., Ropartz, D., Quéméner, B., Bonnin, E. (2012): Innovative enzymatic approach to resolve homogalacturonans based on their methylesterification pattern. *Biomacromolecules*. 13 (5): 1615-1624.
- Ramasamy, U. S., Schols, H. A., Gruppen, H. (2014): Characteristics of bacterial enzymes present during *in vitro* fermentation of chicory root pulp by human faecal microbiota. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 4 (2): 115-124.
- Read, N. W. (1986): Dietary fiber and bowel transit. In: George V. Vahouny und David Kritchevsky (Hg.): Dietary fiber. Basic and clinical aspects. Boston, MA: Springer US: 81-100.
- Reardon, J., Foreman, J. A., Searcy, R. L. (1966): New reactants for the colorimetric determination of ammonia. *Clinica Chimica Acta*. 14 (3): 403-405.
- Remoroza, C., Broxterman, S., Gruppen, H., Schols, H. A. (2014): Two-step enzymatic fingerprinting of sugar beet pectin. *Carbohydrate Polymers*. 108: 338-347.
- Remoroza, C., Cord-Landwehr, S., Leijdekkers, A. G. M., Moerschbacher, B. M., Schols, H. A., Gruppen, H. (2012): Combined HILIC-ELSD/ESI-MSⁿ enables the separation, identification and quantification of sugar beet pectin derived oligomers. *Carbohydrate Polymers*. 90 (1): 41-48.
- Renard, C. M., Crépeau, M. J., Thibault, J. F. (1999): Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry*. 266 (2): 566-574.
- Renard, C. M., Thibault, J.-F. (1993): Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydrate Research*. 244 (1): 99-114.
- Rihouey, C., Morvan, C., Borissova, I., Jauneau, A., Demarty, M., Jarvis, M. (1995): Structural features of CDTA-soluble pectins from flax hypocotyls. *Carbohydrate Polymers*. 28 (2): 159-166.

- Rombouts, F. M., Thibault, J.-F. (1986): Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research*. 154 (1): 177-187.
- Rösch, C., Taverne, N., Venema, K., Gruppen, H., Wells, J. M., Schols, H. A. (2017): Effects of *in vitro* fermentation of barley β -glucan and sugar beet pectin using human fecal inocula on cytokine expression by dendritic cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 61 (1).
- Sabater, C., Sabater, V., Olano, A., Montilla, A., Corzo, N. (2020): Ultrasound-assisted extraction of pectin from artichoke by-products. An artificial neural network approach to pectin characterisation. *Food Hydrocolloids*. 98: 105238.
- Saeman, J. F., Bubl, J. L., Harris, E. E. (1945): Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*. 17 (1): 35-37.
- Sakamoto, T., Sakai, T. (1995): Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. *Phytochemistry*. 39 (4): 821-823.
- Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., Iacomini, M. (2005): Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*. 340 (4): 731-739.
- Sasaki, G. L., Guerrini, M., Serrato, R. V., Santana Filho, A. P., Carlotto, J., Simas-Tosin, F. *et al.* (2014): Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. *Carbohydrate Polymers*. 104: 34-41.
- Savary, B. J., Nuñez, A. (2003): Gas chromatography–mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. *Journal of Chromatography A*. 1017 (1-2): 151-159.
- Scheller, H. V., Jensen, J. K., Sørensen, S. O., Harholt, J., Geshi, N. (2007): Biosynthesis of pectin. *Physiologia Plantarum*. 129 (2): 283-295.
- Scheller, H. V., Ulvskov, P. (2010): Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 263-289.
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., Voragen, A. G. (1995a): A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*. 279: 265-279.
- Schols, H. A., Vierhuis, E., Bakx, E. J., Voragen, A. G. (1995b): Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. *Carbohydrate Research*. 275 (2): 343-360.
- Schols, H. A., Voragen, A. G. (1994): Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research*. 256 (1): 83-95.

6. Literaturverzeichnis

- Schultink, A., Liu, L., Zhu, L., Pauly, M. (2014): Structural diversity and function of xyloglucan sidechain substituents. *Plants*. 3 (4): 526-542.
- Scott, R. W. (1979): Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical Chemistry*. 51 (7): 936-941.
- Sengkhampan, N., Bakx, E. J., Verhoef, R., Schols, H. A., Sajjaanantakul, T., Voragen, A. G. J. (2009): Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and α -linked galactosyl groups. *Carbohydrate Research*. 344 (14): 1842-1851.
- Sheu, W.-S. (2001): Molecular weight averages and polydispersity of polymers. *Journal of Chemical Education*. 78 (4): 554.
- Shi, L. (2016): Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 92: 37-48.
- Showalter, A. M. (1993): Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*. 5 (1): 9-23.
- Showalter, A. M. (2001): Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58 (10): 1399-1417.
- Siew, C. K., Williams, P. A. (2008): Role of protein and ferulic acid in the emulsification properties of sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (11): 4164-4171.
- Simmons, T. J., Mortimer, J. C., Bernardinelli, O. D., Pöppler, A.-C., Brown, S. P., deAzevedo, E. R. et al. (2016): Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*. 7: 13902.
- Simonne, A. H., Simonne, E. H., Eitenmiller, R. R., Mills, H. A., Cresman, C. P. (1997): Could the dumas method replace the kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods? *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 73 (1): 39-45.
- Sims, I. M., Carnachan, S. M., Bell, T. J., Hinkley, S. F. R. (2018): Methylation analysis of polysaccharides: technical advice. *Carbohydrate Polymers*. 188: 1-7.
- Sinitsya, A., Copiková, J., Pavliková, H. (1998): ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy in the analysis of pectins. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 17 (2): 279-292.
- Sudha, M. L., Dharmesh, S. M., Pynam, H., Bhimangouder, S. V., Eipson, S. W., Somasundaram, R., Nanjarajurs, S. M. (2016): Antioxidant and cyto/DNA protective properties of apple pomace enriched bakery products. *Journal of Food Science and Technology*. 53 (4): 1909-1918.
- Sulek, K., Vigsnaes, L. K., Schmidt, L. R., Holck, J., Frandsen, H. L., Smedsgaard, J. et al. (2014): A combined metabolomic and phylogenetic study reveals putatively prebiotic effects of high molecular weight arabino-oligosaccharides when assessed by *in vitro* fermentation in bacterial communities derived from humans. *Anaerobe*. 28: 68-77.

- Sun, H. H., Wooten, J. B., Ryan, W. S., Bokelman, G. H., Åman, P. (1987): Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan. *Carbohydrate Polymers*. 7 (2): 143-158.
- Sun, L., Ropartz, D., Cui, L., Shi, H., Ralet, M.-C., Zhou, Y. (2019): Structural characterization of rhamnogalacturonan domains from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Carbohydrate Polymers*. 203: 119-127.
- Swamy, N. R., Salimath, P. V. (1991): Arabinans from *Cajanus cajan* cotyledon. *Phytochemistry*. 30 (1): 263-265.
- Sweet, D. P., Shapiro, R. H., Albersheim, P. (1975): Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydrate Research*. 40 (2): 217-225.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K. (1997): Chemistry and uses of pectin-a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 37 (1): 47-73.
- Tian, L., Scholte, J., Borewicz, K., van den Bogert, B., Smidt, H., Scheurink, A. J. W. et al. (2016): Effects of pectin supplementation on the fermentation patterns of different structural carbohydrates in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 60 (10): 2256-2266.
- Treuting, P. M., Dintzis, S. M. (2012): Lower gastrointestinal tract. In: Piper M. Treuting und Suzanne Dintzis (Hg.): Comparative anatomy and histology. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press: 177-192.
- Treuting, Piper M.; Dintzis, Suzanne (Hg.) (2012): Comparative anatomy and histology. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Tsumuraya, Y., Mochizuki, N., Hashimoto, Y., Kováč, P. (1990): Purification of an *exo*- β -(1 \rightarrow 3)-D-galactanase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) and its action on arabinogalactan-proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 265 (13): 7207-7215.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., Gordon, J. I. (2007): The human microbiome project. *Nature*. 449 (7164): 804-810.
- Urbat, F., Müller, P., Hildebrand, A., Wefers, D., Bunzel, M. (2019): Comparison and optimization of different protein nitrogen quantitation and residual protein characterization methods in dietary fiber preparations. *Frontiers in Nutrition*. 6, Artikel 127: 127.
- Ushijima, T., Ueno, K., Suzuki, S., Kurimoto, U. (1971): Morphology and chemistry of the bacterial cell wall II. Sugar composition and location of O-antigen in the cell Wall of *Bacteroides convexus*. *Journal of Electron Microscopy*. 20 (4): 32-39.
- Vahouny, George V.; Kritchevsky, David (Hg.) (1986): Dietary fiber. Basic and clinical aspects. Boston, MA: Springer US.

6. Literaturverzeichnis

- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., Visser, R. G. F. (2003): If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*. 132 (4): 1781-1789.
- VO (EG) Nr. 1333/2008: Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe.
- VO (EU) Nr. 231/2012: Verordnung (EU) Nr. 231/2012 der Kommission vom 09. März 2012 mit Spezifikationen für die in den Anhängen II und III der Verordnung (EG) Ne. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates aufgeführten Lebensmittelzusatzstoffe, zuletzt geändert am 20.07.2022 (ABl. Nr. L, 83 S. 1).
- Vogel, J. (2008): Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*. 11 (3): 301-307.
- Voragen, A., Schols, H. A., Pilnik, W. (1986): Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. *Food Hydrocolloids*. 1 (1): 65-70.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., Schols, H. A. (2009): Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*. 20 (2): 263-275.
- Vriesmann, L. C., Petkowicz, C. L. (2013): Highly acetylated pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao L.*) forms gel. *Food Hydrocolloids*. 33 (1): 58-65.
- Wanders, A. J., Feskens, E. J. M., Jonathan, M. C., Schols, H. A., Graaf, C. de, Mars, M. (2014): Pectin is not pectin: a randomized trial on the effect of different physicochemical properties of dietary fiber on appetite and energy intake. *Physiology & Behavior*. 128: 212-219.
- Wefers, D., Bunzel, M. (2016a): Arabinan and galactan oligosaccharide profiling by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (22): 4656-4664.
- Wefers, D., Bunzel, M. (2016b): NMR spectroscopic profiling of arabinan and galactan structural elements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (50): 9559-9568.
- Wefers, D., Flörchinger, R., Bunzel, M. (2018): Detailed structural characterization of arabinans and galactans of 14 apple cultivars before and after cold storage. *Frontiers in Plant Science*. 9: 1451.
- Wefers, D., Tyl, C. E., Bunzel, M. (2014): Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. *Frontiers in chemistry*. 2: 100.
- West, C., Elfakir, C., Lafosse, M. (2010): Porous graphitic carbon: a versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*. 1217 (19): 3201-3216.

- Westphal, Y., Kühnel, S., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Gruppen, H. (2010a): LC/CE-MS tools for the analysis of complex arabino-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*. 345 (15): 2239-2251.
- Westphal, Y., Kühnel, S., Waard, P. de, Hinz, S. W. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Gruppen, H. (2010b): Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. *Carbohydrate Research*. 345 (9): 1180-1189.
- Westphal, Y., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Gruppen, H. (2010c): Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis. *Journal of Chromatography. A*. 1217 (5): 689-695.
- Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J. P. (2001): Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. 47 (1/2): 9-27.
- Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A. *et al.* (2009): Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides – a comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Products*. 29 (2-3): 571-580.
- Willis, R. B., Montgomery, M. E., Allen, P. R. (1996): Improved method for manual, colorimetric determination of total kjeldahl nitrogen using salicylate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (7): 1804-1807.
- Wuhrer, M., Boer, A. R. de, Deelder, A. M. (2009): Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 28 (2): 192-206.
- Wyatt, P. J. (2021): Differential light scattering and the measurement of molecules and nanoparticles: a review. *Analytica Chimica Acta: X*. 7-8: 100070.
- Xu, J., Yue, R.-Q., Liu, J., Ho, H.-M., Yi, T., Chen, H.-B., Han, Q.-B. (2014): Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 67: 205-209.
- Yapo, B. M. (2009): Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (4): 1572-1578.
- Yapo, B. M. (2011a): Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - a new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*. 86 (2): 373-385.
- Yapo, B. M. (2011b): Rhamnogalacturonan-I: a structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. *Polymer Reviews*. 51 (4): 391-413.

6. Literaturverzeichnis

- Yapo, B. M. (2012): On the colorimetric-sulfuric acid analysis of uronic acids in food materials: potential sources of discrepancies in data and how to circumvent them. *Food Analytical Methods*. 5 (2): 195-215.
- Yeoh, S., Shi, J., Langrish, T. (2008): Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*. 218 (1-3): 229-237.
- Zaia, J. (2004): Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*. 23 (3): 161-227.
- Zandleven, J., Beldman, G., Bosveld, M., Schols, H. A., Voragen, A. (2006): Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase. *Carbohydrate Polymers*. 65 (4): 495-503.
- ZERBE, OLIVER; JURT, SIMON (2013): Applied NMR spectroscopy for chemists and life scientists. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Zhang, T., Yang, Y., Liang, Y., Jiao, X., Zhao, C. (2018): Beneficial effect of intestinal fermentation of natural polysaccharides. *Nutrients*. 10 (8).
- Zoetendal, E. G., Wright, A. von, Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. L., Vos, W. M. de (2002): Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (7): 3401-3407.

7. CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE

7.1. CHEMIKALIEN

Chemikalie	Hersteller, Reinheit	GHS- Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze
1-Methylimidazol	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	05, 06	302, 311, 314	280, 301+312+330, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
3-Phenylphenol	Sigma- Aldrich, 100 %	07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Aceton	VWR, ≥ 99,8 %	02, 07	225, 319, 336,	210, 233, 305+351+338
Ameisensäure	Merck, 98 - 100 %	02, 05, 06	226, 302, 314, 331	210, 280, 301+330+31, 304+340, 305+351+338, 308+310
Ammoniak	Sigma- Aldrich, 25 %	05, 07, 09	314, 335, 410	261, 271, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338
Ammoniumchlorid	Sigma- Aldrich, 99,9 %	07	302, 319	264, 270, 280, 301+312, 305+351+338, 337+313
Ammoniumformiat	VWR, ≥ 99 %	07	315, 319, 335	280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+311
Arabinan (Sugar Beet)	Megazyme, ~ 95 %	-	-	-
Citronensäure	Carl Roth, ≥ 99,5 %	07	319, 335	261, 280, 305+351+338
Deuteriumoxid	Deutero, 99,9 %	-	-	-
D-Galactosamin Hydrochlorid	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-

7. Chemikalien und Instrumente

D-Galactose	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
D-Galacturonsäure Monohydrat	Fluka, ≥ 97 %	-	-	-
D-Glucose	Sigma- Aldrich, ≥ 99,5 %	-	-	-
D-Glucuronsäure	Sigma- Aldrich, ≥ 98 %	-	-	-
Dichlormethan	VWR, ≥ 99,5 %	07, 08	315, 319, 351, 336	201, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+311
Dimethylsulfoxid	Carl Roth, ≥ 99,5 %	-	-	-
Dinatriumtetraborat	Carl Roth, ≥ 99 %	07, 08	319, 360FD	201, 308+313
D-Mannose	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
D-Xylose	Sigma- Aldrich, ≥ 99,9 %	-	-	-
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, ≥ 99 %	07, 08	332, 373	260, 314
Essigsäure	Sigma- Aldrich, ≥ 99,8 %	02, 05	226, 314	210, 233, 240, 280, 303+361+353, 305+351+338
Essigsäureanhydrid	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	02, 06, 05	226, 302, 314, 330	310, 280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 308+310
Ethanol, vergäht	VWR, 99 %	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233
Kjeldahl-Tabletten nach Wiener	Fluka	-	412	273, 501

7. Chemikalien und Instrumente

L-Arabinose	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
Linear 1,5- α -L-Arabinan (Sugar Beet)	Megazyme, ≥ 95 %	-	-	-
Lithiumchlorid	Sigma- Aldrich, ≥ 99,9 %	07	302, 315, 319	264, 270, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338
L-Rhamnose	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
Methanolische Salzsäure	Sigma- Aldrich, 1,25 M	02, 06, 08, 05	225, 290, 301+311+331, 370	210, 233, 280, 301+310, 303+361+353, 304+340+311
Methyliodid	VWR, ≥ 99 %	06, 08, 07	312, 315, 335, 351, 301+331	201, 280, 301+310, 302+352, 304+340, 311
Natriumacetat	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
Natriumbordeuterid	Carl Roth, ≥ 98 %D	02, 05, 06, 08	260, 301, 314, 360FD	280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 310, 402+404
Natriumborhydrid	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	02, 05, 06, 08	260, 301, 314, 360FD	301, 314, 360FD, 260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Natriumhydroxid	Carl Roth, ≥ 99 %	05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Natriumtetraborat	Sigma- Aldrich, ≥ 99 %	07, 08	319, 360FD	201, 308+313
Natriumthiosulfat	Carl Roth, ≥ 99 %	-	-	-
Natriumtrimethylsilylpropionat	Sigma- Aldrich, ≥ 98 %D	-	-	-

7. Chemikalien und Instrumente

<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	06, 05	302, 311, 317, 318	280, 301+312+330, 302+352+312, 305+351+338+310	
Pectic Galactan	Megazyme, ≥ 90 %	-	-	-	
Raffinose	Alfa Aesar, ≥ 99 %	-	-	-	
Rhamnogalacturonan (from Soy Bean Pectic Fibre)	Megazyme, ≥ 97 %	-	-	-	
Salpetersäure	Sigma-Aldrich, 65 %	02, 06, 05	272, 290, 314, 331	210, 220, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338	
Schwefelsäure	VWR, ≥ 95 %	05	290, 314	234, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338	
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	05, 07	314, 332, 412	261, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338	
GHS02	GHS05	GHS06	GHS07	GHS08	GHS09
					
Entzündlich	Ätzend	Giftig	Gesundheits- schädlich	Systemische Gesundheits- gefährdung	Umwelt- gefährlich

7.2. ENZYME

Enzym	Organismus/Herkunft	EC-Nummer	Aktivität	Hersteller
VP2002/12 (α -Amylase)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	Firma Erbslöh Geisenheim GmbH
Amyloglucosidase (AMG 300 L)	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.3	300 AGU/g	Novozymes A/S
VP2002/5 (Cellulase 1)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	Firma Erbslöh Geisenheim GmbH
VP2002/6 (Cellulase 2)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	Firma Erbslöh Geisenheim GmbH
VP2002/7 (Cellulase 3)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	Firma Erbslöh Geisenheim GmbH
VP2002/8 (Cellulase 4)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	Firma Erbslöh Geisenheim GmbH
VP2002/9 (Cellulase 5)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	Firma Erbslöh Geisenheim GmbH
VP2002/10 (Cellulase 6)	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	Firma Erbslöh Geisenheim GmbH
VP2002/11 (Cellulase 7)	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>	-	-	Firma Erbslöh Geisenheim GmbH
Celluclast®	<i>Trichoderma reesei</i>	232.734.4	700 EGU/g	Novozymes A/S
Driselase®	<i>Basidiomycetes</i> sp.	-	-	Sigma-Aldrich
endo-Arabinanase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.99	9 U/mg	Megazyme/ Neogen
endo-Galactanase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.89	408 U/mg	Megazyme/ Neogen
Viscozyme L®	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	Novozymes A/S

7.3. PUFFER UND REAGENZIEN

80 % Ethanol für die Extraktion der Mono-, Di- und Oligosaccharide aus den Fäzesproben

- 200 mL Wasser
- zu 800 mL Ethanol (99 %) geben

3-Phenylphenollösung (0,15 %) als Färbereagenz für die Bestimmung des Galacturonsäuregehalts

- für die 0,5 % Natriumhydroxidlösung 0,1 g Natriumhydroxid abwiegen und in 20 mL bidestilliertes Wasser lösen
- 0,03 g 3-Phenylphenol in 20 mL 0,5 % Natriumhydroxidlösung lösen

Ammoniaklösung (2 M) für die Bestimmung der Bindungsverhältnisse im Pektin

- 7,46 mL Ammoniak (25 %)
- 50 mL bidestilliertes Wasser

Acetonitril/Wasser mit 0,1 % Ameisensäure für die Elution der säurehaltigen Oligosaccharide von der PGC-Kartusche

- 50 mL bidestilliertes Wasser zu 50 mL Acetonitril (100 %) geben
- 100 µL Ameisensäure zugeben

Citronensäurelösung (4,5 mM) zur Pektinextraktion

- 1,7 g Citronensäure
- 2 L vollentsalztes Wasser

Enzymlösung für die enzymatische *in vitro* Fermentation der Pektine (Driselase®)

- 20 mg Driselase®
- 100 mL bidestilliertes Wasser

Enzymlösung für die enzymatische *in vitro* Fermentation der Pektine (Viscozyme L®)

- 20 µL Viscozyme L®
- 100 mL bidestilliertes Wasser

Lösung der Pektinstandardsubstanzen für die enzymatische *in vitro* Fermentation

- 8 mg Rhamnogalacturonan (Soy Bean), Lineares Arabinan (Sugar Beet), Arabinan (Sugar Beet) bzw. Galactan (Potato)
- 4 mL bidestilliertes Wasser

Pektinlösung für die enzymatische *in vitro* Fermentation der Pektine

- 50 mg Pektin (kommerziell)
- 25 mL bidestilliertes Wasser

Natriumnitratlösung (50 mM) für die Analyse mittels HPSEC

- 4,249 g Natriumnitrat
- 1 L bidestilliertes Wasser

Natriumthiosulfatlösung (100 mM) für die Bestimmung der Bindungsverhältnisse im Pektin

- 3,95 g Natriumthiosulfat
- 250 mL bidestilliertes Wasser

Schwefelsaure Natriumtetraboratlösung (12,5 mM) für die Bestimmung des Galacturonsäuregehalts

- 251 mg Natriumtetraborat
- 1 L konzentrierte (18 M) Schwefelsäure

TMSP-Lösung für die Quantifizierung von freigesetztem Methanol und freigesetzter Essigsäure

- 25 mg 3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3-*d*₄-säure Natriumsalz einwiegen
- In 50 mL D₂O lösen

Trifluoressigsäurelösung (2 M) für die Hydrolyse zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

- 84,6 mL bidestilliertes Wasser
- 15,4 mL Trifluoressigsäure

7. Chemikalien und Instrumente

7.4. INSTRUMENTE

7.4.1. Verwendete Säulen

Säule	Partikelgröße	Porengröße	Maße (Länge x Innendurchmesser)	Hersteller
CarboPac PA20	6 µm	-	150 mm x 3,0 mm	Dionex™, ThermoFisher Scientific™
CarboPac PA200	6 µm	-	250 mm x 3,0 mm	Dionex™, ThermoFisher Scientific™
CarboPac PA100 Semi-Preparative	8,5 µm	-	250 mm x 9,0 mm	Dionex, ThermoFisher Scientific
DB-225/DB-225 (MS)	0,25 µm	-	30 m x 0,25 mm	Agilent Technologies
TSKgel G2500 PW _{XL}	7 µm	<20 nm	300 mm x 7,8 mm	Tosoh Bioscience
TSKgel G3000 PW _{XL}	7 µm	20 nm	300 mm x 7,8 mm	Tosoh Bioscience
TSKgel G4000 PW _{XL}	10 µm	<50 nm	300 mm x 7,8 mm	Tosoh Bioscience
TSKgel G6000 PW _{XL}	13 µm	<100 nm	300 mm x 7,8 mm	Tosoh Bioscience
Acquity UPLC BEH Amide	1,7 µm	-	150 mm x 2,1 mm	Waters Corporation

7.4.2. Analysengeräte

HPAEC-PAD

Hersteller:	Dionex™, ThermoFisher Scientific™
Pumpe:	Dionex™ ICS-5000 Dual Pump
Autosampler:	Dionex™ AS-AP
Detektorkompartiment:	Dionex™ ICS-5000 DC
Detektoren:	2x Electrochemical Detector (PAD)

HPAEC-PAD/MS

Hersteller:	Dionex™, ThermoFisher Scientific™
Pumpe (Eluent):	Dionex™ ICS-6000 Single Pump
Autosampler:	Dionex™ AS-AP
Detektorkompartiment:	Dionex™ ICS-6000 DC
Detektor (PAD/CD):	Electrochemical Detector, Conductivity Detector
Suppressor:	Dionex™ AERS 500e (4 mm)
Pumpe (Regenerent):	Dionex™ AXP-Pump
Pumpe (LiCl):	Dionex™ AXP-MS-Pump
Detektor (MS):	ThermoFisher Scientific™ ISQ IC Mass Spectrometer

HPAEC-PAD/Fraktionssammler

Hersteller:	Dionex™, ThermoFisher Scientific™
Kompartimente:	s. HPAEC-PAD/MS (außer AXP-MS & MS)
Fraktionssammler:	UltiMate™ AFC-3000, ThermoFisher Scientific™

GC-FID

Hersteller:	Shimadzu
Bezeichnung:	GC-2010 Plus
Autosampler:	AOC-20i Auto Injector
Detektor:	FID-2010 Plus

7. Chemikalien und Instrumente

GC-MS

Hersteller:	Shimadzu
Bezeichnung:	GC-2010 Plus
Autosampler:	AOC-20i Auto Injector
Detektor:	GC-MS QP 2010 Ultra

HPSEC-RI/MALS

Hersteller:	Hitachi, Merck
Pumpe:	L-7100
Autosampler:	L-7200
Interface:	D-7000
Detektor:	LaChrom L-7490 (RI-Detektor) SLD7100, PSS Polymer Solutions (MALS-Detektor)

UHPLC-MS²

Hersteller:	ThermoFisher Scientific™
Bezeichnung:	Vanquish Flex Binary UHPLC System
Detektor:	Q Exactive™ Plus Orbitrap MS Detektor

NMR-Spektrometer

Hersteller:	Bruker Corporation
Bezeichnung:	Ascend 500
Feldstärke:	500 MHz
Probenkopf:	<i>Prodigy</i> , Kryoprobenkopf

Photometer

Hersteller:	Jasco
Bezeichnung:	V-550, UV/Vis-Spektrophotometer

8. ARBEITSVORSCHRIFTEN

8.1. EXTRAKTION DER PEKTINE

Citruspektin CP-L1

- Einwaage von ca. 50 g Citrustrester in 1 L Erlenmeyerkolben und Zugabe von 1 L 4,5 mM Citronensäurelösung (Vorquellen über 1 h und anschließende Überprüfung des pH-Wertes ~3,5)
- Extraktion über 90 min bei 95 °C im Wasserbad unter regelmäßigem Schwenken des Gemischs, anschließendes Abkühlen der Lösung auf Eis Zugabe von 500 mg Cellulase 4 (vgl. Tabelle B 5) und Inkubation über 60 min bei 40 °C im Schüttelinkubator
- Abtrennen des Feststoffs mittels Zentrifugation und Abgießen über Filtertuch
- Einengen des Extraktes auf ca. 1/3 – 1/4 des Volumens und anschließende Präzipitation der Polysaccharidstrukturen mit doppeltem Volumen an Ethanol über Nacht
- Abtrennen der Polysaccharidstrukturen über robustes Filtertuch und mehrmaliges Waschen mit 80 % Ethanol und reinem Ethanol
- Trocknen der Proben über Nacht im Abzug und anschließend im Trockenschank bei 40 °C
- Erneutes Lösen der Pektine mit einem Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis von 1:25 bei 40 °C über 2 h im Schüttelinkubator
- Zugabe von 500 mg Cellulase 4 und Inkubation über 1 h bei 40 °C im Schüttelinkubator
- Erneutes Ausfällen, Abtrennen und Trocknen der Polysaccharidstrukturen (s. oben)
- Mahlen der Proben auf einen Partikeldurchmesser <0,5 mm und Lagern der Proben bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss

Citruspektin CP-L2

- Einwaage von ca. 50 g Citrustrester in 1 L Erlenmeyerkolben und Zugabe von 1 L 4,5 mM Citronensäurelösung
- Vorquellen über 1 h und anschließendes Einstellen des pH-Wertes mit 4 M Salpetersäure auf pH = 2
- Extraktion über 240 min bei 95 °C im Wasserbad unter regelmäßigem Schwenken des Gemischs, anschließendes Abkühlen der Lösung auf Eis
- Inkubation ohne Enzymzugabe über 60 min bei 40 °C im Schüttelinkubator
- Abtrennen des Feststoffs mittels Zentrifugation und Abgießen über Filtertuch
- Einengen des Extraktes auf ca. 1/3 – 1/4 des Volumens und anschließende Präzipitation der Polysaccharidstrukturen mit doppeltem Volumen an Ethanol über Nacht
- Abtrennen der Polysaccharidstrukturen über robustes Filtertuch und mehrmaliges Waschen mit 80 % Ethanol und reinem Ethanol

8. Arbeitsvorschriften

- Trocknen der Proben über Nacht im Abzug und anschließend im Trockenschank bei 40 °C
- Erneutes Lösen der Pektine mit einem Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis von 1:25 bei 40 °C über 2 h im Schüttelinkubator
- Inkubation über 1 h bei 40 °C im Schüttelinkubator
- Erneutes Ausfällen, Abtrennen und Trocknen der Polysaccharidstrukturen (s. oben)
- Mahlen der Proben auf einen Partikeldurchmesser < 0,5 mm und Lagern der Proben bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss

Apfelpektin AP-L

- Einwaage von ca. 50 g Apfeltrester in 1 L Erlenmeyerkolben und Zugabe von 1 L vollentsalztem Wasser (Vorquellen: 1 h und anschließende Überprüfung des pH-Wertes ~ 3,7)
- Extraktion über 240 min bei 95 °C im Wasserbad unter regelmäßigem Schwenken des Gemischs, anschließendes Abkühlen der Lösung auf Eis Zugabe von 500 mg Cellulase 4 (vgl. Tabelle B 5) und Inkubation über 60 min bei 40 °C im Schüttelinkubator
- Abtrennen des Feststoffs mittels Zentrifugation und Abgießen über Filtertuch
- Einengen des Extraktes auf ca. 1/3 - 1/4 des Volumens und anschließende Präzipitation der Polysaccharidstrukturen mit doppeltem Volumen an Ethanol über Nacht
- Abtrennen der Polysaccharidstrukturen über robustes Filtertuch und mehrmaliges Waschen mit 80 % Ethanol und reinem Ethanol
- Trocknen der Proben über Nacht im Abzug und anschließend im Trockenschank bei 40 °C
- Erneutes Lösen der Pektine mit einem Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis von 1:25 bei 40 °C über 2 h im Schüttelinkubator
- Zugabe von 10 U/g Amyloglucosidase (Novozymes A/S) und 10 mg/g α -Amylase (Firma Erbslöh Geisenheim GmbH) und Inkubation über 1 h bei 40 °C im Schüttelinkubator
- Erneutes Ausfällen, Abtrennen, Waschen und Trocknen der Polysaccharidstrukturen (s. oben)
- Mahlen der Proben auf einen Partikeldurchmesser < 0,5 mm und Lagern der Proben bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss

8.2. STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DER PEKTINE

8.2.1. Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Kombinierte Methanolyse und Trifluoressigsäure-Hydrolyse

- Einwaage von 0,5 mg bzw. 6-10 mg Probenmaterial in ein 4 mL Vial
- Zugabe von 500 µL 1,25 M methanolischer HCl und Hydrolyse über 16 h bei 80 °C im Trockenschrank
- Abkühlen und Überführen von 400 µL bzw. 10 µL in 1,5 mL Vial
- Eindampfen der Probe bis zur Trockene
- Zugabe von jeweils 125 µL 2 M TFA und Hydrolyse über 1 h bei 121 °C im Trockenschrank
- Eindampfen der Probe bis zur Trockene
- Zugabe von jeweils 200 µL Ethanol und erneutes Eindampfen bis zur Trockene (2x)
- Aufnahme der Probe in 500 µL bzw. 1000 µL Wasser
- entsprechendes Verdünnen der Probe und Analyse mittels HPAEC-PAD

Schwefelsäurehydrolyse

- Einwaage von 1-10 mg Probenmaterial in ein 4 mL Vial und Versetzen mit Glasperlen
- Zugabe von 150 µL 12 M Schwefelsäure und gutes Benetzen des Probenmaterials
- Inkubation über 30 min im Eisbad und Vortexen der Probe im 10 min Intervall
- Stehen lassen der Probe über 2 h bei Raumtemperatur und Vortexen im 30 min Intervall
- Zugabe von 975 µL Wasser und Hydrolyse über 3 h bei 100 °C im Trockenschrank
- Abkühlen und Filtrieren der Proben durch Spritzenfilter (0,45 µM, Teflon)
- Versetzen von 100 µL Filtrat mit 75 µL 4 M NaOH und 825 µL Wasser
- Verdünnen der Probe 1:2 bzw. 1:20 und Analyse mittels HPAEC-PAD

Analyse mittels HPAEC-PAD

Säule:	Dionex CarboPac PA20 (6 µm, 150 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD), AgCl-Elektrode (20 °C)

8. Arbeitsvorschriften

Kalibrierung: 10 Monosaccharide: Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xylose, Mannose, Fructose, Galacturonsäure, Glucuronsäure;

2 Fünfpunktkalibrierungen (1 - 25 μ M und 25 - 125 μ M), quadratische Anpassung

Gradientenelution:

Tabelle A 1: Gradientenprogramm der HPAEC-PAD Analyse zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	90	10	0
0,0	90	10	0
1,5	97	3	0
22,0	97	3	0
32,0	0	100	0
32,1	0	60	40
42,0	0	60	40

Tabelle A 2: Gradientenprogramm der HPAEC-PAD Analyse zur Auftrennung und Bestimmung des Verhältnisses von Galactosamin und Rhamnose. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	97	3	0
0,0	97	3	0
14,5	97	3	0
14,6	0	60	40
25,0	0	60	40

8.2.2. Methylierungsanalyse

Carboxylreduktion (optional)

- Einwaage von 5 mg Probe und Lösen in Wasser
- Zugabe von 200 µL MES Puffer (pH 4,75)
- Zugabe von 200 mg Carbodiimid in Wasser (zum Lösen kurz unter Rühren erhitzen)
- Vortexen und Stehen lassen über 3 h bei Raumtemperatur
- Zugabe von 1 mL 4 M Imidazolösung (pH 7,0) unter Eiskühlung
- Zugabe von 70 mg Natriumborodeuterid in Wasser unter Eiskühlung
- Inkubation über 3 h bei Raumtemperatur
- Langsame Zugabe von ca. 1 mL Eisessig, bis keine Gasbildung mehr stattfindet
- Dialyse der Probelösung über 24 h gegen Wasser (MWCO: 3500), mindestens dreimaliges Wechseln des Wassers
- Gefriertrocknen der Probe in 15 mL Pyrexglas

Methylierung (zweifache Durchführung)

- Einwaage von 5 mg gut getrocknetem und homogenem Probenmaterial in ein 15 mL Pyrexglas oder Verwenden der gefriergetrockneten Probe nach Carboxylreduktion
- Zugabe von 2 mL DMSO und Behandeln über 15 min im Ultraschallbad
- Quellen über Nacht und erneutes Behandeln über 15 min im Ultraschallbad
- Zugabe von 100 mg frisch unter Stickstoff gemörsertem NaOH
- Reaktion über 90 min im Ultraschallbad und über 90 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 1 mL Methyljodid
- Inkubation über 30 min im Ultraschallbad und über 30 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 3 mL Dichlormethan und 5 mL 0,1 M Natriumthiosulfatlösung und gutes Durchmischen
- Abnahme wässrigen Phase und zweifaches Waschen der organischen Phase mit Wasser
- Abrotieren des Lösungsmittels und Abdampfen von möglichen Lösungsmittelresten unter Stickstoffstrom
- Trocknen der Proben über Nacht bei 40 °C im Trockenschrank

Hydrolyse, Reduktion und Derivatisierung

- Zugabe von 2 mL TFA und Hydrolyse über 90 min bei 121 °C im Trockenschrank
- Abrotieren des Lösungsmittels und Abdampfen von möglichen Lösungsmittelresten unter Stickstoffstrom
- Zugabe von 20 mg Natriumborodeuterid in 0,3 mL Ammoniak und Inkubation über 60 min bei Raumtemperatur

8. Arbeitsvorschriften

- Abbruch der Reaktion durch die Zugabe von 100 µL Eisessig
- Zugabe von 450 µL 1-Methylimidazol und 3 mL Essigsäureanhydrid unter Eiskühlung
- Inkubation über 30 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 3 mL Wasser unter Eiskühlung
- Extraktion mit 5 mL Dichlormethan
- Dreimaliges Waschen der organischen Phase mit Wasser
- Ausfrieren des Restwassers über Nacht bei -18 °C
- Überführen der organischen Phase in 4 mL Vial
- Analyse Proben mittels GC-MS/GC-FID

Analyse mittels GC-MS und GC-FID

Säule:	DB-225MS
Injektionsvolumen:	5 µL
Injektionstemperatur:	220 °C
Injektionsart:	Split im Verhältnis 10:1
Trägergas:	Helium
Trägergasgeschwindigkeit:	40 cm/s
Detektion (MS):	Elektronenstoß (EI) mit 70 eV, Transferline-Temperatur: 220 °C
Detektion (FID):	Temperatur 240 °C
Temperaturprogramm:	Anfangstemperatur 140 °C für 1 min Aufheizphase (4 min) mit 20 °C/min bis 220 °C, halten für 25 min

8.2.3. Enzymatisches Profiling der Arabinane und Galactane

Enzymatische Hydrolyse

- Herstellen einer Pektinlösung mit der Konzentration 1 mg/mL
- Überführen von 200 µL der Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäß
- Zugabe von 2 µL einer 20 U/mL *endo*-Arabinanase-Lösung (Megazymes, 200 U/g) bzw. einer 100 U/mL *endo*-Galactanase-Lösung (Megazymes, 1000 U/mg); getrennte Ansätze für Arabinan- bzw. Galactan-Profiling
- Vermischen des Reaktionsgemischs (nicht vortexen!)
- Inkubation über 24 h bei 40 °C im Eppischüttler
- Inaktivierung der Enzyme über 5 min bei 95 °C
- Zugabe von 15 µL Überstand und 15 µL 100 µM Raffinoselösung zu 120 µL Wasser
- Analyse mittels HPAEC-PAD

Analyse mittels HPAEC-PAD

Säule:	Dionex CarboPac PA200 (6 µm, 250 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD) mittels AgCl-Elektrode, 20 °C

Gradientenelution:

Tabelle A 3: Gradientenprogramm der HPAEC-PAD Analyse zur Bestimmung der durch *endo*-Arabinanase freigesetzten Arabinan oligosaccharide. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	50	50	0
60,0	50	30	20
75,0	0	40	60
75,1	0	0	100
90,0	0	0	100

Tabelle A 4: Gradientenprogramm der HPAEC-PAD Analyse zur Bestimmung der durch *endo*-Galactanase freigesetzten Galactan oligosaccharide. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	50	50	0
60,0	50	30	20
75,0	0	40	60
75,1	0	0	100
90,0	0	0	100

8. Arbeitsvorschriften

8.2.4. Bestimmung des Methylierungs- und Acetylierungsgrades der polymergebundenen Galacturonsäuren

Bestimmung der Uronsäurekonzentration im Polysaccharid

Vorhydrolyse

- Einwaage von 10 mg Probenmaterial in ein 3,5 mL Vial und Zugabe von Glasperlen
- Zugabe von 300 µL 12 M Schwefelsäure, anschließendes Vortexen
- 30 min auf Eis stehen lassen und alle 10 min vortexen
- 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen und alle 30 min vortexen
- Zugabe von 1,95 mL Wasser
- Filtrieren durch einen PTFE-Filter (0,45 µm) und Verdünnen des Filtrats (1|50)

Photometrische Bestimmung

- Je 600 µL der verdünnten Probe in zwei 15 mL Pyrexgläser geben
- Zugabe von 3,6 mL schwefelsaurer Natriumtetraboratlösung (12,5 mM in konzentrierter Schwefelsäure (18 M)) und umgehendes Vortexen
- Inkubation über 5 min bei 100 °C im Wasserbad
- Direktes Abkühlen im Eisbad
- Je Probe ein Pyrexglas mit 60 µL 3-Phenylphenollösung (0,15 % in 0,5 % NaOH) und eine Probe für den Blindwert mit 60 µL 0,5 % NaOH versetzen und umgehend vortexen
- Messen der Extinktion nach 20 min Inkubation bei 520 nm

Kalibrierung

- Externe Kalibrierung mit 10 - 85 mg/L Galacturonsäurelösung, Vorgehen analog zu Probenlösung (mit Blindwert für jeden Kalibrierpunkt)

Bestimmung des Methanol- und Essigsäuregehalts nach Verseifung

Verseifung

- Einwaage von 20 mg Probenmaterial in 3,5 mL GC-Vial
- Zugabe von 1,5 mL 2 M NaOH in D₂O und 150 µL TMSP (0,5 mg/mL in D₂O)
- Hydrolysieren über 2 h im Ultraschallbad
- Absetzen lassen und Überstand membranfiltrieren (PTFE, 0,45 µm)
- Überführen von 550 µL in NMR Tube

NMR Messung

Pulssequenz:	Zg30 (90 ° Puls)
Lösungsmittel:	D ₂ O
Anzahl Scans:	32
Relaxation Delay (D1 Zeit):	35 Sekunden

8.2.5. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung und des gewichtsgemittelten Molekulargewichts

- Herstellen einer Probenlösung mit einer Konzentration von 2 mg/mL (2 mL Eppi) in 50 mM Natriumnitrat
- Lösen über 2 h bei 40 °C im Eppischüttler
- Abzentrifugieren und Überführen des Überstands in 1,5 mL GC-Vial

Analyse mittels HPSEC-RI/MALS

Säule:	TSKgel PW _{XL} 4000 (10 µm, 300 mm x 7,8 mm, Tosoh) für Pektine / TSKgel PW _{XL} 2500 (7 µm, 300 mm x 7,8 mm, Tosoh) gekoppelt mit TSKgel PW _{XL} 3000 (7 µm, 300 mm x 7,8 mm, Tosoh) für Polysaccharide nach Fermentation
Eluent:	0,05 mol/L Natriumnitrat (isokratisch)
Fluss:	0,5 mL/min
Injektionsvolumen:	50 µL
Säulentemperatur:	40 °C
Detektion:	Brechungsindexdetektor (RI) gekoppelt mit einem <i>Multi Angle Light Scattering Detector</i> (MALS) mit $dn/dc = 0,135 \text{ mL/g}$

8.2.6. Bestimmung des Aschegehalts

- Ausglühen eines Porzellantiegels bei 550 °C und anschließendes Wiegen
- Einwiegen von etwa 100 mg der Pektine in den Porzellantiegel und Veraschen der Proben bei 550 °C über 4 h
- Bei unzureichender Veraschung: Zugabe von Wasser und erneutes Veraschen
- Abkühlen der Porzellantiegel im Exsikkator und anschließendes Wiegen, Errechnen des Aschegehalts

8. Arbeitsvorschriften

8.2.7. Bestimmung des Proteingehalts

- Einwiegen von etwa 100 mg der Pektine in Kjeldahl-Kolben und Zugabe von Glasperlen
- Zugabe von 500 mg Selenreaktionsgemisch (Kjeldahl-Katalysator) und 5 mL konzentrierter Schwefelsäure
- Erhitzen des Gemischs auf einem Heizblock über 1-2 h bis zur Auflösung des Probenrückstands
- Abkühlen der Probe und Zugabe von 10 mL Wasser
- Überführen der Probe in 50 mL Messkolben und Auffüllen bis zur Markierung mit Wasser
- Herstellung der Kalibrierlösungen:
 - NH_4Cl -Stammlösung mit 1000 mg N/L herstellen (382 mg NH_4Cl | 100 mL Wasser)
 - Kalibrierlösungen mit 0,1 mg N/L, 1 mg N/L und 10 mg N/L unter Zugabe von 4 mL Schwefelsäure herstellen: (20 μL / 200 μL / 2000 μL der NH_4Cl -Stammlösung + 4 mL konzentrierte Schwefelsäure | 200 mL Wasser)
 - 50 mL der jeweiligen Kalibrierlösung in Becherglas überführen und
- Überführen von 50 mL der Kalibrierlösungen bzw. 1 mL der Aufschlusslösung der Probe zusammen mit 49 mL Wasser in ein Becherglas
- Zugabe von 3 mL 2 M NaOH und sofortiges Kalibrieren bzw. Messen des Stickstoffgehalts [mg/L] der jeweiligen Pektinprobe mit einer ammoniaksensitiven Elektrode

8.3. ENZYMATISCHE FERMENTATION

- Herstellung einer Probenlösung (Pektine und Pektinstandardsubstanzen) und einer Enzymlösung (Driselase & Viscozyme L)
- Pipettieren von 0,5 mL Enzymlösung und 0,5 mL Pektinlösung in ein 1,5 mL Eppi, sowie mitführen einer Blindprobe mit 0,5 mL Wasser und 0,5 mL Pektinlösung
- Inkubieren über 0,5 h, 4 h, und 16 h bei 37 °C im Eppischüttler
- Inaktivieren der Enzyme über 5 min bei 95 °C im Wasserbad
- Zentrifugieren über 5 min
- Überführen des Überstands in 1,5 mL GC-Vial für Analyse mittels HPSEC-RI (s. Kapitel 8.2.5) und in ein HPAEC-Vial für Analyse mittels HPAEC-PAD/MS (s. Kapitel 8.5.1)

8.4. AUFARBEITUNG DER PROBEN NACH FERMENTATION

8.4.1. *In vitro* Fermentation der Pektine

- Zentrifugieren der Fäzessuspension, um residuale Feststoffe zu entfernen
- Überführen von 10 mL des Fermentationsüberstandes in 50 mL Falcontube
- Zugabe von 40 mL 99,5 % Ethanol
- Vortexen und Präzipitation der Proben über Nacht
- Zentrifugieren der Proben und überführen des Überstandes in 50 mL Falcontube
- Mehrmaliges Waschen des Rückstandes mit 80 % Ethanol und vereinen mit Überstand

Aufarbeitung Rückstand

- Quantitatives Überführen des Rückstands in vorgetrocknetes und konstantgewogenes 3,5 mL GC-Vial
- Evaporieren bis zur Trockene
- Gravimetrische Bestimmung der residualen ethanolunlöslichen Strukturen
- Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung mittels HPSEC-RI (s. Kapitel 8.2.5) sowie Analyse der Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (s. Kapitel 8.2.1)

Aufarbeitung Überstand

- Evaporieren von je 20 mL der Probenlösungen mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene
- Aufnehmen des Rückstands in 2 mL bidest. Wasser und Analyse mittels HPAEC-PAD/MS (s. Kapitel 8.5.1) sowie Aufnahme in ACN/Wasser (50/50, v/v) und Analyse mittels UHPLC-MS² (s. Kapitel 8.5.2)

8.4.2. *In vivo* Fermentation der Pektine im murinen Modell

- Überführen der gefrorenen Mäusekotpellets in 50 mL Falcontube
- Zugabe von 20 mL 80 % Ethanol und Schwenken über 2 h bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator
- Zerkleinern der Mäusekotpellets mit Spatel
- Schwenken über 2 h bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator
- Zentrifugieren und überführen des Überstands in 50 mL Falcontube

8. Arbeitsvorschriften

Aufarbeitung Rückstand

- Quantitatives Überführen des Rückstands in vorgetrocknetes und konstantgewogenes 3,5 mL GC-Vial
- Evaporieren bis zur Trockene
- Gravimetrische Bestimmung der residualen ethanolunlöslichen Strukturen
- Analyse der Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse (s. Kapitel 8.2.1)

Aufarbeitung Überstand

- Evaporieren von je 10 mL der Probenlösungen mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene
- Aufnehmen des Rückstands in 1 mL bidest. Wasser und Analyse mittels HPAEC-PAD/MS (s. Kapitel 8.5.1) sowie Aufnahme in ACN/Wasser (50/50, v/v) und Analyse mittels UHPLC-MS² (s. Kapitel 8.5.2)

8.4.3. *In vivo* Fermentation der Pektine im humanen Modell

- Überführen der gefrorenen und in PBS suspendierten Fäzesproben in 50 mL Falcontube
- Zugabe von 20 mL 80 % Ethanol und Schwenken über 2 h bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator
- Zentrifugieren und überführen des Überstands in 50 mL Falcontube

Aufarbeitung Rückstand

- Quantitatives Überführen des Rückstands in vorgetrocknetes und konstantgewogenes 3,5 mL GC-Vial
- Evaporieren bis zur Trockene
- Gravimetrische Bestimmung der residualen ethanolunlöslichen Strukturen
- Analyse der Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse (s. Kapitel 8.2.1)

Aufarbeitung Überstand

- Evaporieren der Probenlösungen mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene
- Aufnehmen des Rückstands in 2 mL bidest. Wasser
- Entsalzen über PGC-Kartusche:
 - Konditionieren mit 2 x 1,5 mL ACN & 2 x 1,5 mL bidest. Wasser
 - Quantitatives Aufgeben der Probe (Nachspülen des Vials mit bidest. Wasser)
 - Nachspülen mit 4 x 1,5 mL bidest. Wasser, um Salze und neutrale Monosaccharide zu entfernen
 - Eluieren der Probe mit 2 x 1,5 mL ACN/Wasser (50/50, v/v) mit 0,1 % Ameisensäure in 3,5 mL GC-Vial
 - Rekonditionieren der PGC-Kartusche mit 2 x 1,5 mL Wasser und 2 x 1,5 mL ACN
- Evaporieren der Probe bis zur Trockene und 2 x Co-Evaporieren mit 1 mL Ethanol
- Aufnahme des Rückstands in 1 mL bidest. Wasser und Analyse mittels HPAEC-PAD/MS (s. Kapitel 8.5.1) sowie Aufnahme in ACN/Wasser (50/50, v/v) und Analyse mittels UHPLC-MS² (s. Kapitel 8.5.2)

8.5. CHARAKTERISIERUNG FREIGESETZTER MONO-, DI- UND OLIGOSACCHARIDE

8.5.1. Analyse mittels HPAEC-PAD/MS

Säule:	Dionex CarboPac PA200 (6 µm, 250 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD) mittels AgCl-Elektrode, 20 °C sowie Massenspektrometrische Detektion
MS-Detektion:	elektrolytisch regenerierender Suppressor mit externer Wasserzufuhr und anschließender Detektion der Leitfähigkeit zur Überprüfung der Entsalzung Zufuhr von 500 µM Lithiumchloridlösung (0,05 mL/min) Elektrosprayionisation (ESI) im positiven Modus (Lithium-Addukte) Single Quadrupol im <i>Total Ion Current</i> von 100 - 1000 Fragmentierung ausgewählter Proben über <i>Collision-Induced Dissociation</i> (CID) mit CID-Spannung von 100 eV

8. Arbeitsvorschriften

Gradientenelution:

Tabelle A 5: Gradientenprogramm der HPAEC-PAD Analyse zur chromatographischen Auftrennung der ethanollöslichen Strukturen nach den verschiedenen Fermentationsversuchen (s. Kapitel 8.4). Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	50	50	0
60,0	50	30	20
75,0	0	40	60
75,1	0	0	100
90,0	0	0	100

8.5.2. Analyse mittels UHPLC-MS²

Säule: ACQUITY UPLC BEH Amidsäule (1,7 µm, 150 mm x 2,1 mm, Waters)
Fluss: 0,4 mL/min
Injektionsvolumen: 10 µL
Säulentemperatur: 35 °C
MS-Detektion: Aufnahmezeit von 4 - 31
ESI-Quelle im negativen Modus
Orbitrap im TIC von 150 - 2000
Normalized Collision Energy 35

Tabelle A 6: Gradientenprogramm der UHPLC-MS² Analyse zur chromatographischen Auftrennung der ethanollöslichen Strukturen nach den verschiedenen Fermentationsversuchen (s. Kapitel 8.4). Eluent A: Wasser + 0,1 % Ameisensäure, Eluent B: CAN + 0,1 % Ameisensäure

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,1	20	80
1,0	20	80
31,0	68	32
32,0	20	80
40,0	20	80

8.5.3. Präparative Isolierung der Mono-, Di- und Oligosaccharide

Säule:	Dionex CarboPac PA200 (6 μm , 250 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 μL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD) mittels AgCl-Elektrode, 20 °C
Fraktionssammler:	Sammelperiode: 300 s Delay-Zeit: 60 s Sammeln von 10 Läufen und Poolen der Fraktionen

8.5.4. NMR-Spektroskopische Analyse der präparativ isolierten Strukturen

Referenzierung:	Aceton ($\delta_{\text{H}} = 2,22 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}} = 2,22 \text{ ppm}$)
Pulssequenz:	die Experimente wurden mit den Standardparametersätzen der Firma Bruker durchgeführt und ein <i>Non-Uniform Sampling</i> (NUS) Anteil von 50 % eingesetzt ^1H : zg30 (Scanzahl 64) HSQC: hsqcedetgp (Scanzahl 64, NUS)

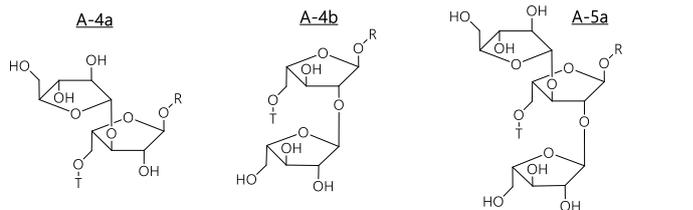
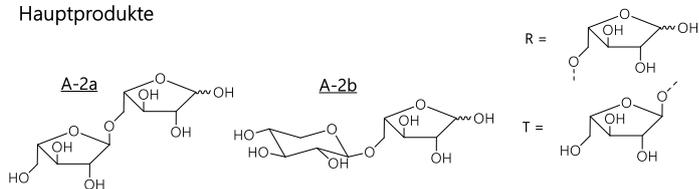
9. ANHANG

$$\text{Länge des Rückgrats der Arabinane} = \frac{1,5\text{-Araf} + 1,2,5\text{-Araf} + 1,3,5\text{-Araf} + 1,2,3,5\text{-Araf} + t\text{-Araf}}{(t\text{-Araf} + t\text{-Arap}) - 1,2,5\text{-Araf} - 1,3,5\text{-Araf} - (2 \cdot 1,2,3,5\text{-Araf})}$$

Formel 1

9.1. ABBILDUNGEN

Hauptprodukte



Nebenprodukte

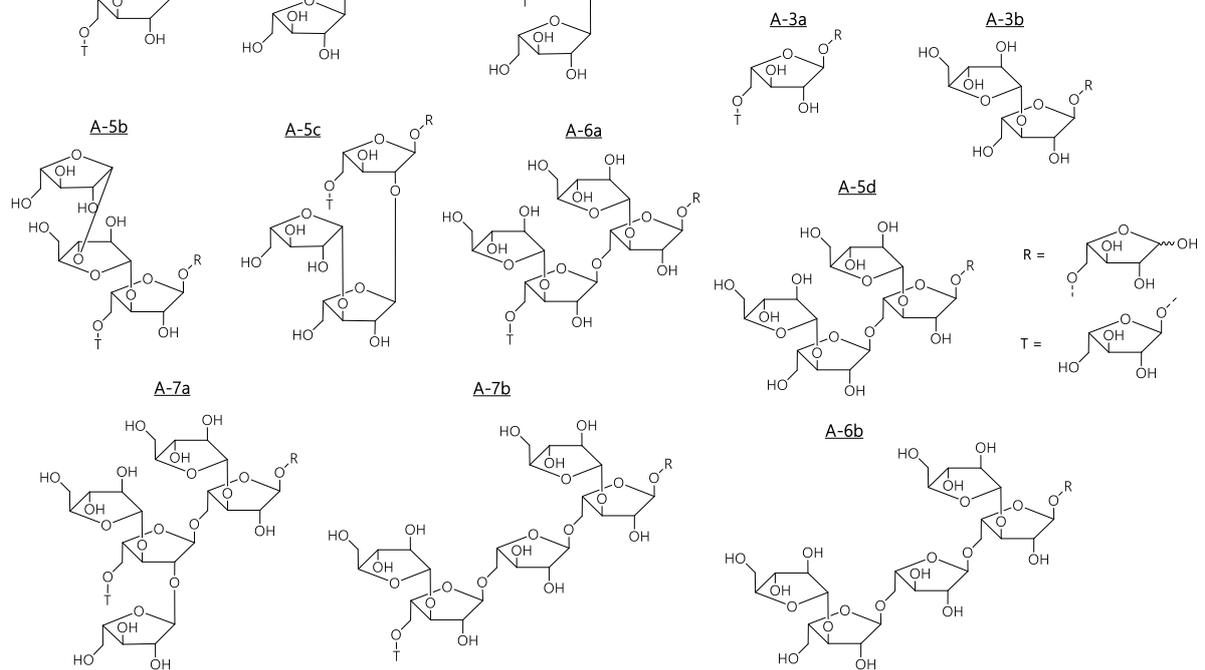


Abbildung B 1: Strukturen der Arabinanoligosaccharide mit entsprechender Bezeichnung nach Inkubation mit *endo*-Arabinanase

9. Anhang

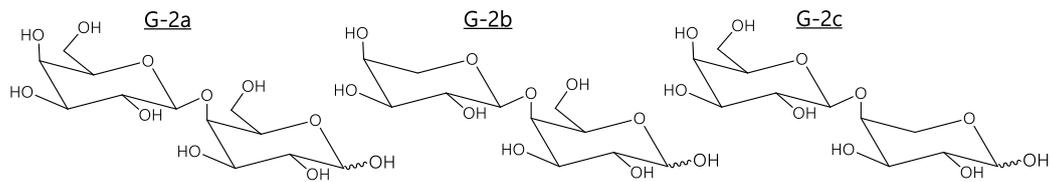


Abbildung B 2: Strukturen der (Arabino-)Galactan oligosaccharide mit zugehöriger Bezeichnung nach Inkubation mit *endo*-Galactanase

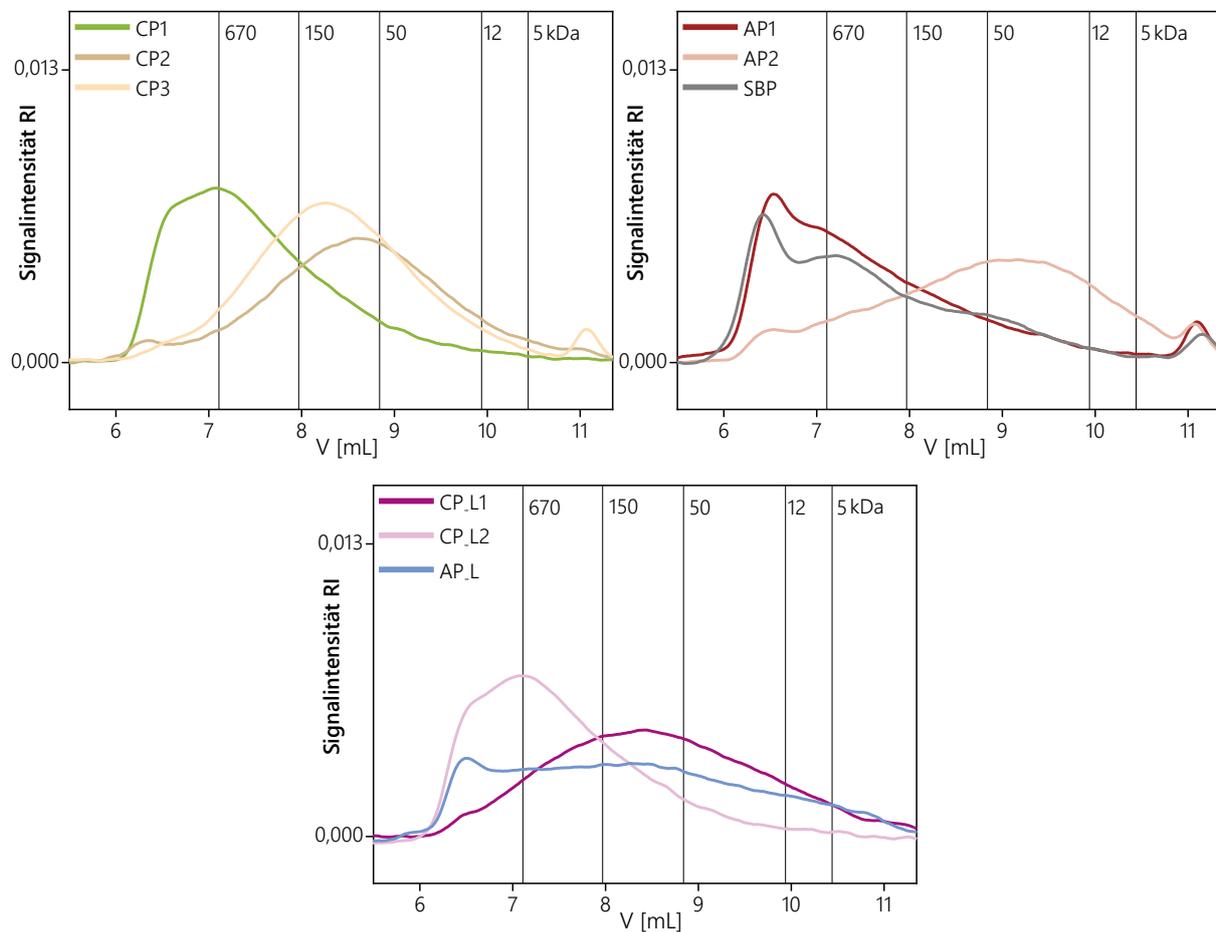


Abbildung B 3: Chromatogramme der sechs kommerziellen Pektine und der drei labortechnisch extrahierten Pektine. Die Molekulargewichtsverteilungen wurden mittels Größenausschlusschromatographie (HPSEC) mit Brechungsindexdetektor (RI) als Lösungen in Natriumnitrat (2 mg/mL) analysiert. Dextranstandardsubstanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten (5 - 670 kDa) wurden als Referenzsubstanzen verwendet (vertikali Linien). AP: kommerzielles Apfelpektin, AP-L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP-L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

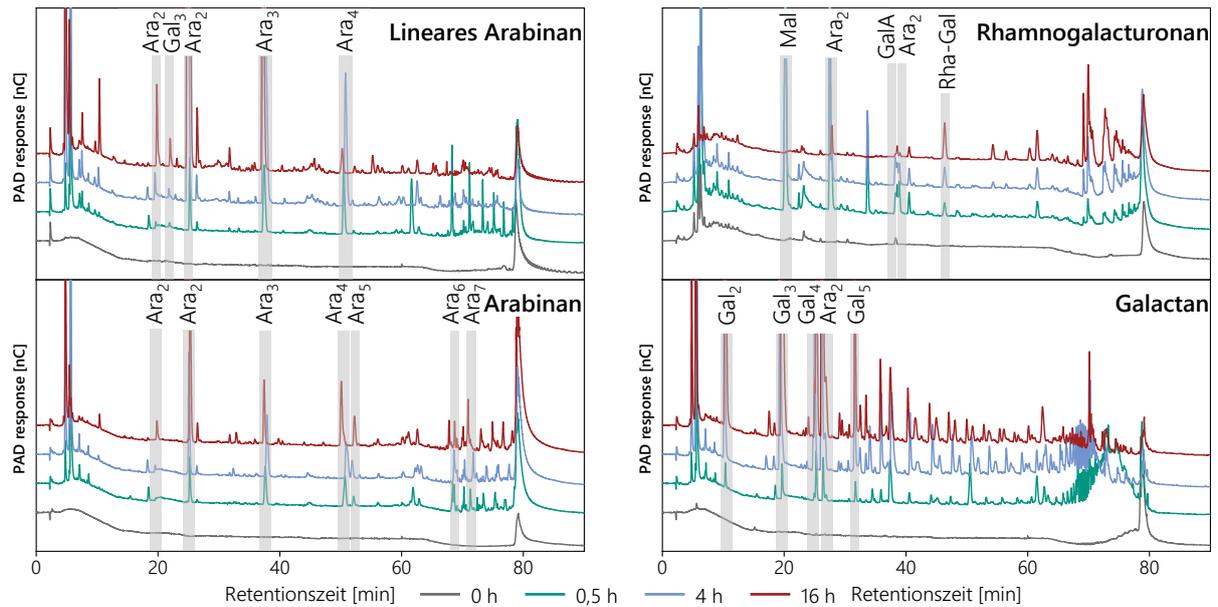


Abbildung B 4: Chromatogramme der Pektinstandardsubstanzen nach enzymatischer Fermentation mit Driselase über verschiedene Zeiten. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigten Mono-, Di- und Oligosaccharide wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Die zugehörigen Signale sind durch graue Balken gekennzeichnet. Ara_x: Arabinose(-oligosaccharide), Gal_x: Galactose(-oligosaccharide), GalA: Galacturonsäure, Mal: Maltose, Rha: Rhamnose, x: Anzahl der monomeren Einheiten

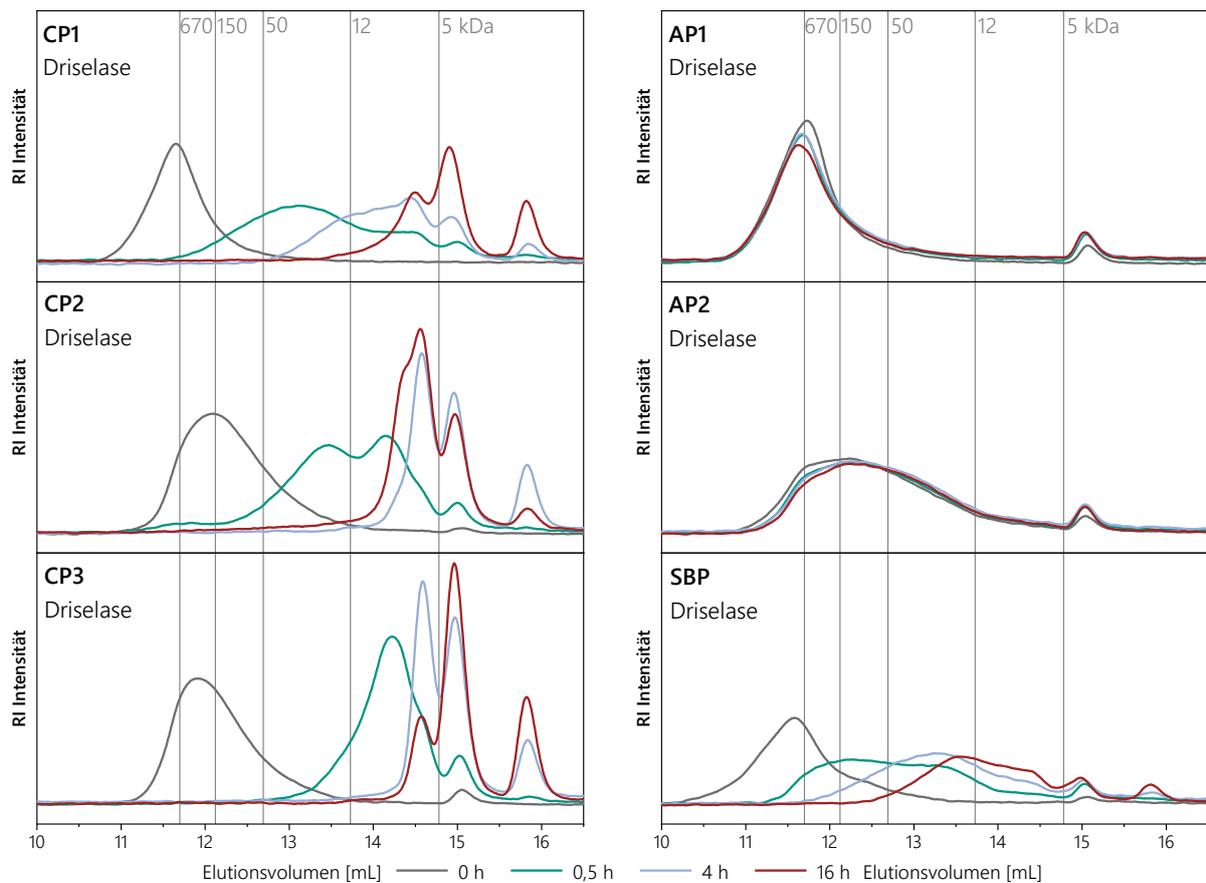


Abbildung B 5: Chromatogramme der kommerziellen Pektine nach enzymatischer Fermentation mit Driselase. Die Molekulargewichtsverteilung wurde mittels Größenausschlusschromatographie (HPSEC) mit Brechungsindexdetektor (RI) analysiert. Dextranstandardsubstanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten (5 - 670 kDa) wurden als Referenz verwendet (vertikale Linien). AP: kommerzielles Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

9. Anhang

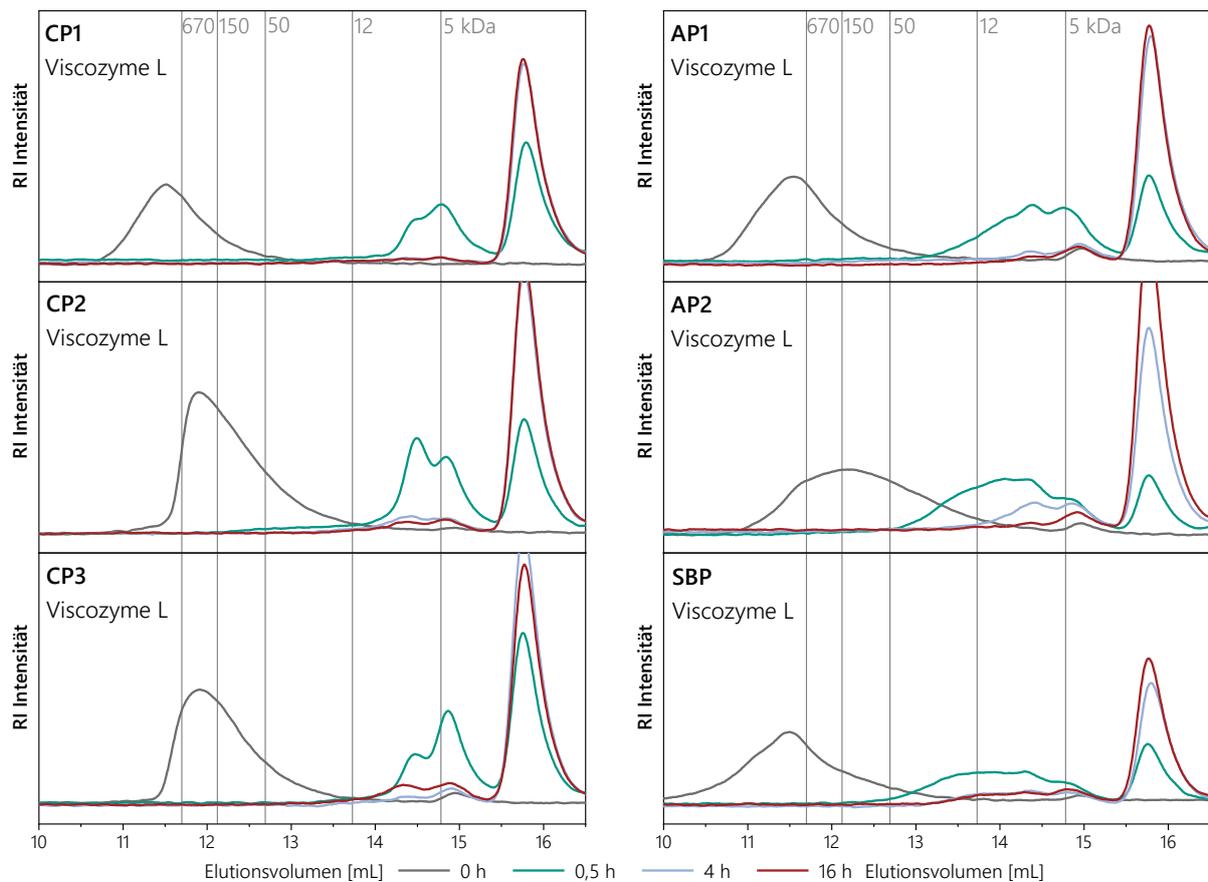


Abbildung B 6: Chromatogramme der kommerziellen Pektine nach enzymatischer Fermentation mit Viscozyme L. Die Molekulargewichtsverteilung wurde mittels Größenausschlusschromatographie (HPSEC) mit Brechungsindexdetektor (RI) analysiert. Dextranstandardsubstanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten (5 - 670 kDa) wurden als Referenz verwendet (vertikale Linien). AP: kommerzielles Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

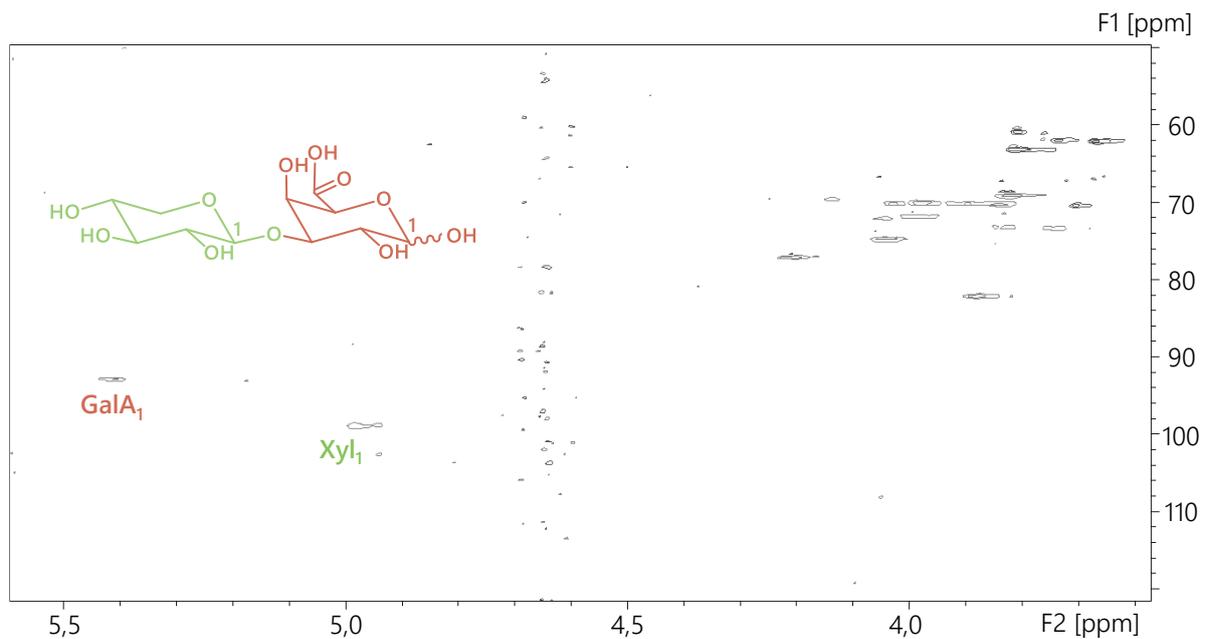


Abbildung B 7: Struktur und HSQC-NMR-Spektrum eines Disaccharids aus Xylose und Galacturonsäure mit einem $m/z = 333$ nach präparativer Isolierung mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion und gekoppeltem Fraktionssammler

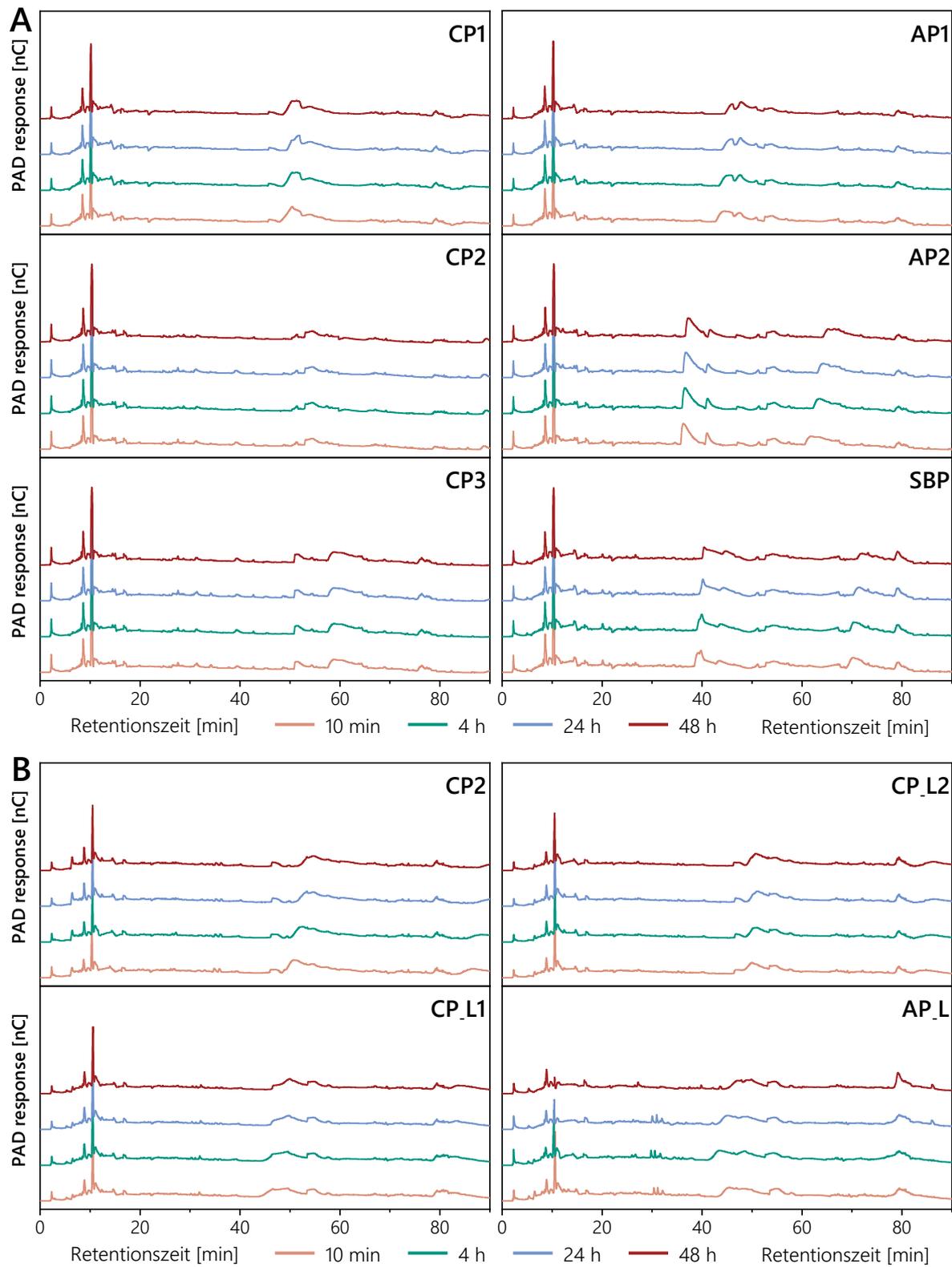


Abbildung B 8: Chromatogramme der ethanollöslichen Fraktionen der sechs kommerziellen Pektine (A) und der drei labortechnisch extrahierten Pektine (B) nach Inkubation ohne Zugabe von humanen Fäzesproben über verschiedene Zeiten. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Untersuchung möglicher Mono-, Di- und Oligosaccharide wurde über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse durchgeführt. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisches Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP.L: labortechnisches Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

9. Anhang

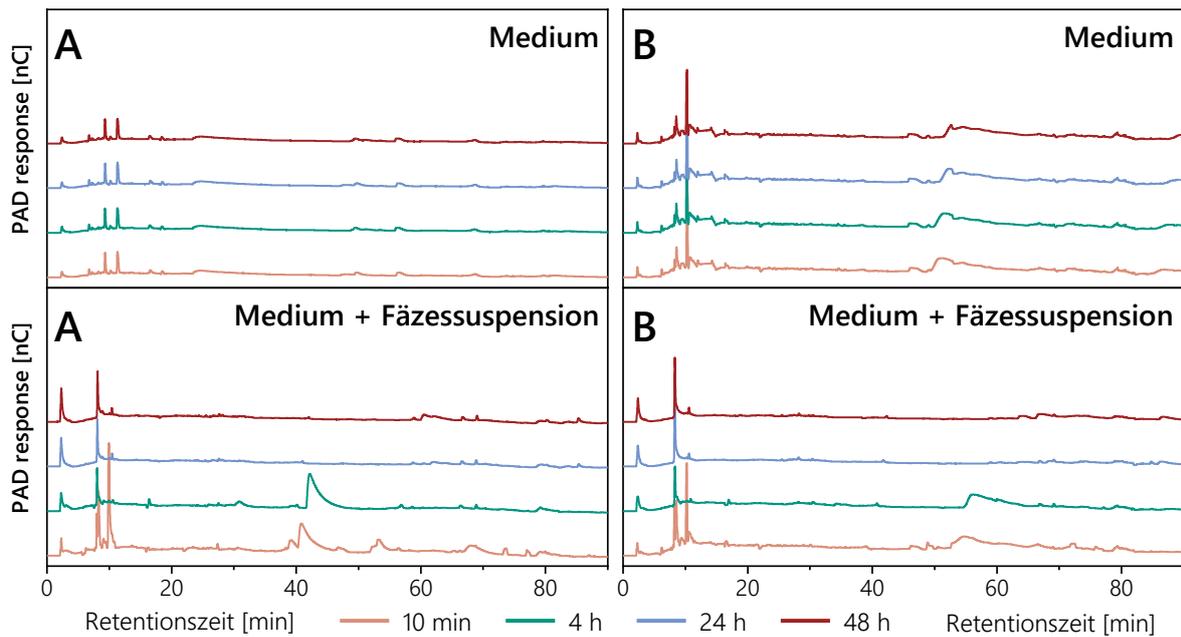


Abbildung B 9: Chromatogramme der ethanollöslichen Fraktionen der verschiedenen Kontrollproben der *in vitro* Fermentationsansätze. Die Inkubationen erfolgten ohne Zugabe von Pektinen. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Untersuchung möglicher Mono-, Di- und Oligosaccharide wurde über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse durchgeführt

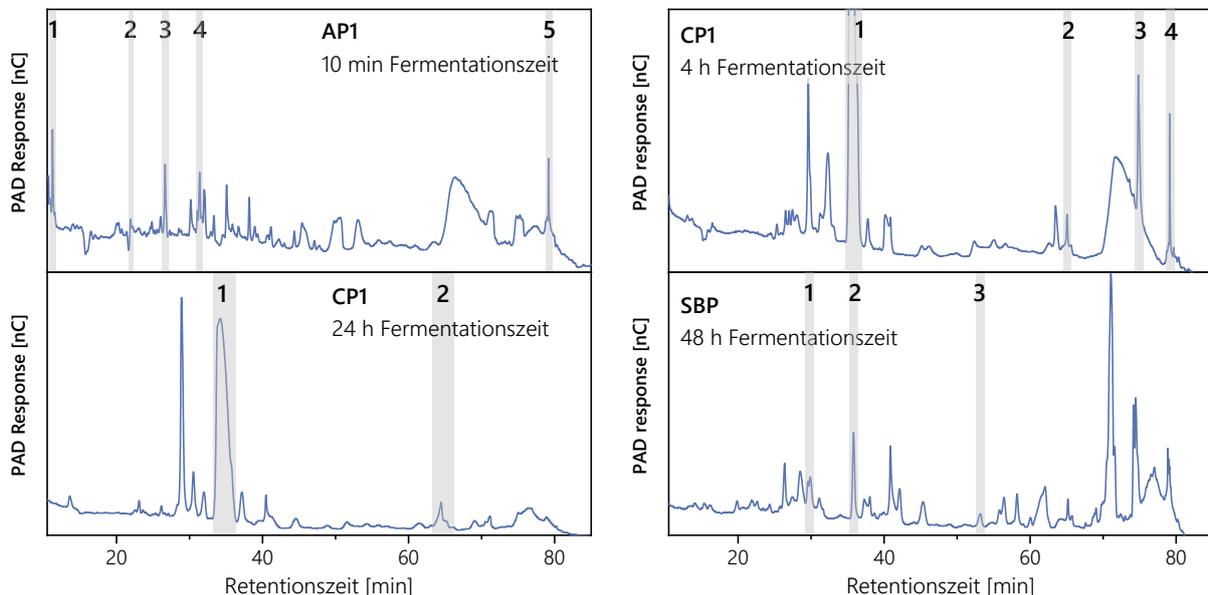


Abbildung B 10: Präparative Isolierung der Verbindungen nach *in vitro* Fermentation des kommerziellen Apfelpektins 1 (AP1, 10 min *in vitro* Fermentationszeit), des kommerziellen Citruspektins 1 (CP1, 4 h und 24 h *in vitro* Fermentationszeit) und des kommerziellen Zuckerrübenpektins (SBP, 48 h *in vitro* Fermentationszeit). Die Isolierung der Verbindungen erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD) gekoppelt mit einem Fraktionssammler. Die isolierten Verbindungen wurden zur Überprüfung reinjiziert und hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung analysiert (Tabelle B 16)

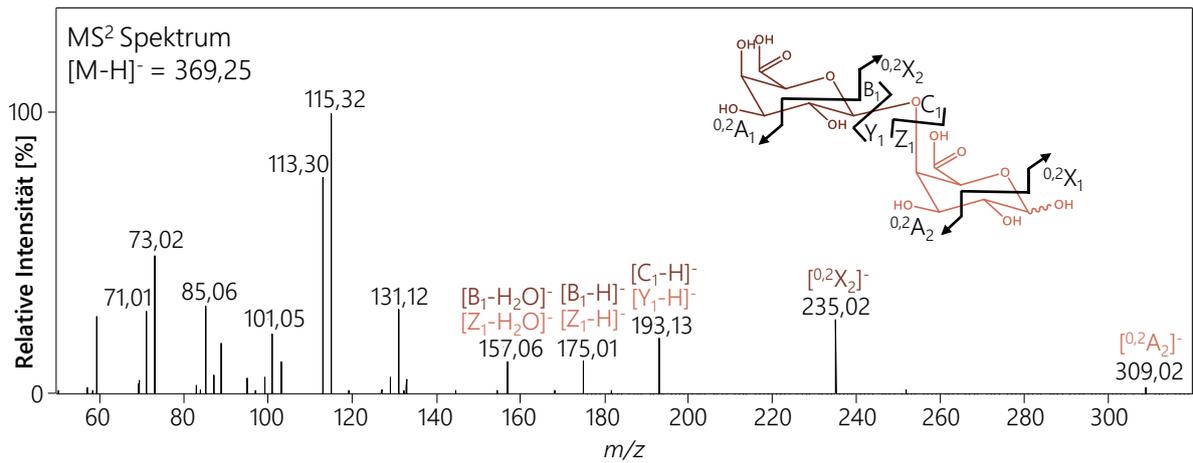


Abbildung B 11: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS²) eines Dimers aus Galacturonsäureeinheiten ($m/z = 369,25$ ([M-H]⁻)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

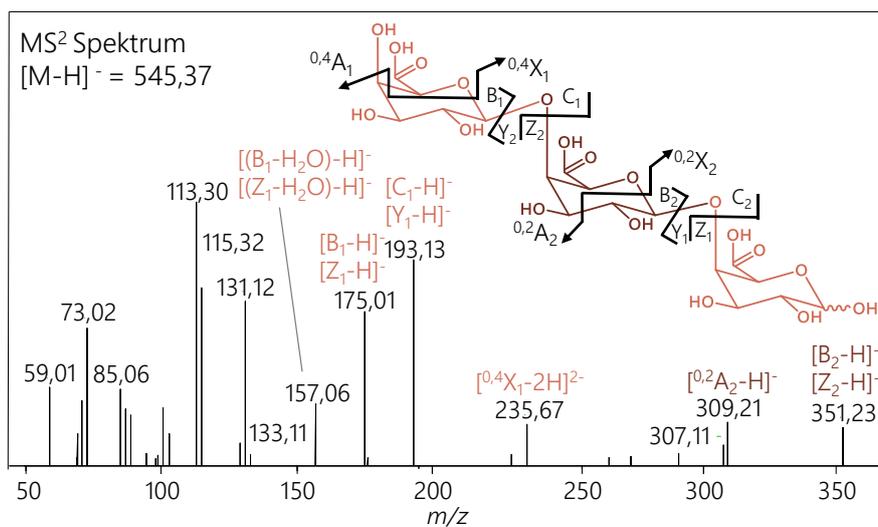


Abbildung B 12: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS²) eines Trimers aus Galacturonsäureeinheiten ($m/z = 545,37$ ([M-H]⁻)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

9. Anhang

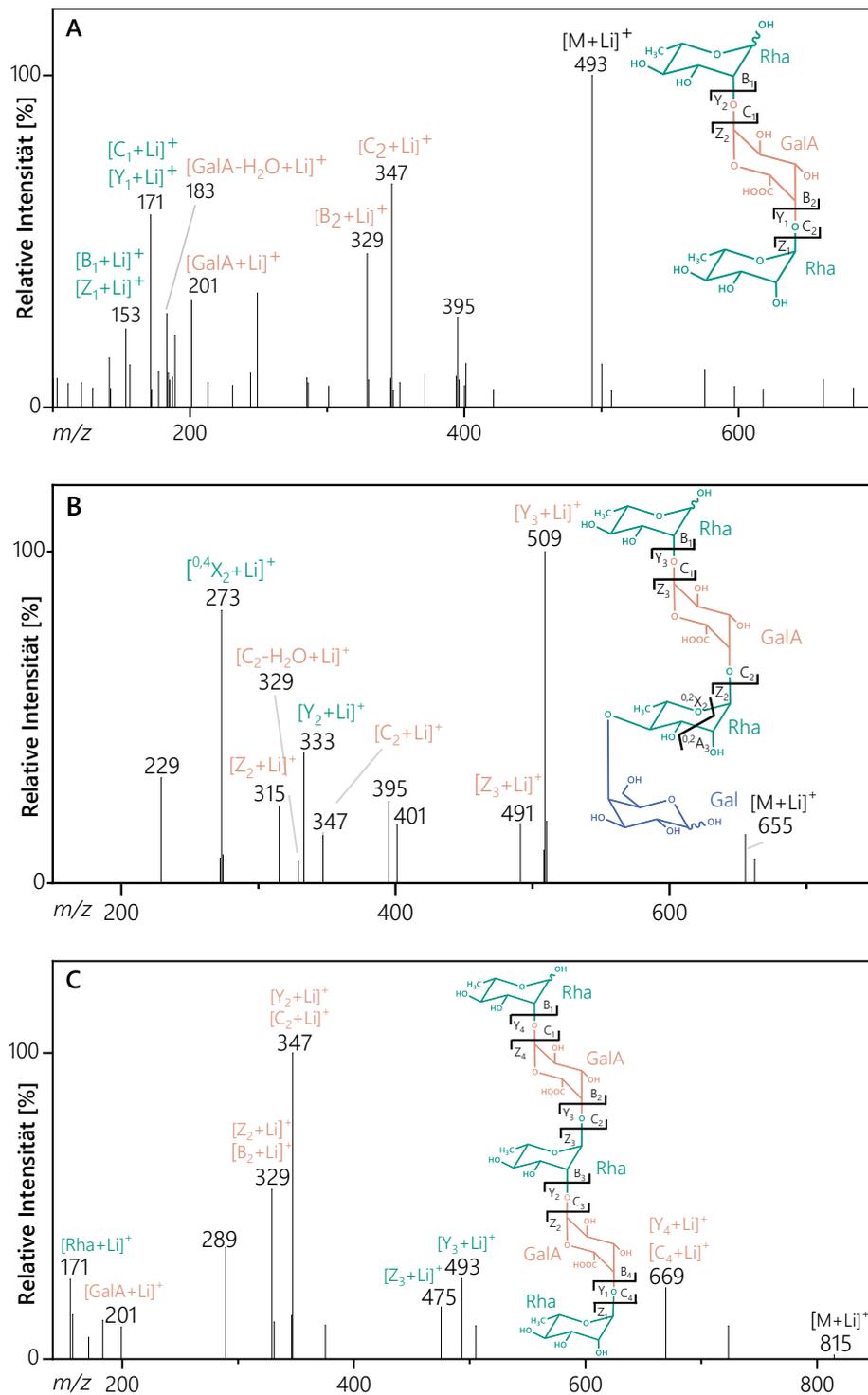


Abbildung B 13: Fragmentierungsmuster der Signale mit einer Retentionszeit von 30,2 min (A), 35,5 min (B) und 54,0 min (C) nach 48 h *in vitro* Fermentation von SBP. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die massenspektrometrische (MS) Analyse erfolgte unter Anwendung von *Collision-Induced Dissoziation* (CID, CID Spannung: 100 eV). Diese Experimente lassen auf folgende Oligosaccharide des Typ I Rhamnogalacturonans schließen: Rha-GalA-Rha (A), Rha-GalA-Rha-Gal (B), Rha-GalA-Rha-GalA-Rha (C). GalA: Galacturonsäure, Li: Lithium, Rha: Rhamnose

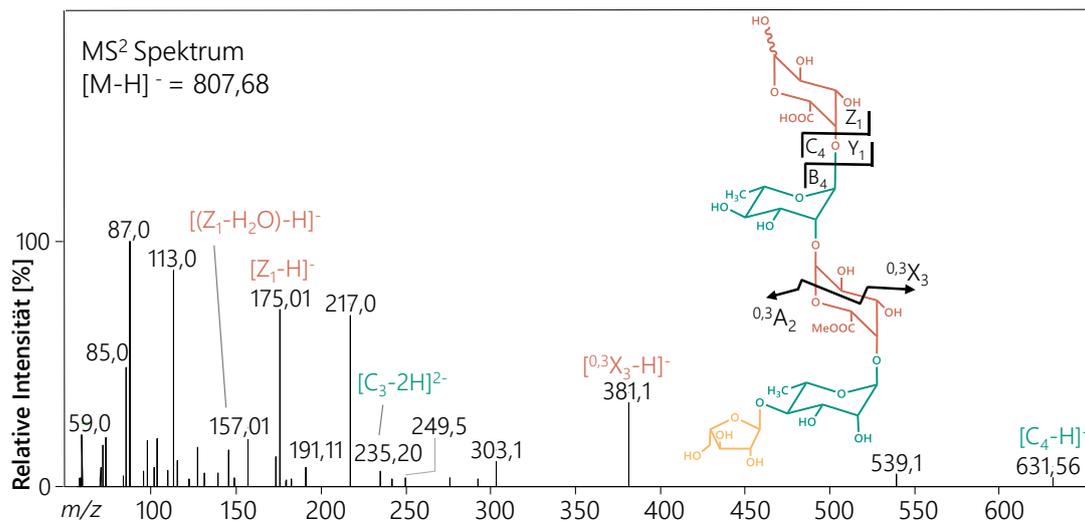


Abbildung B 14: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS²) eines Pentamers aus 2 Rhamnoseeinheiten (Rha, türkis), einer Arabinoseeinheit und 2 Galacturonsäureeinheiten (GalA, rot) mit einer Methylierung an GalA 3 ausgehend vom reduzierenden Ende des Moleküls ($m/z = 807,68$ ([M-H]⁻)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

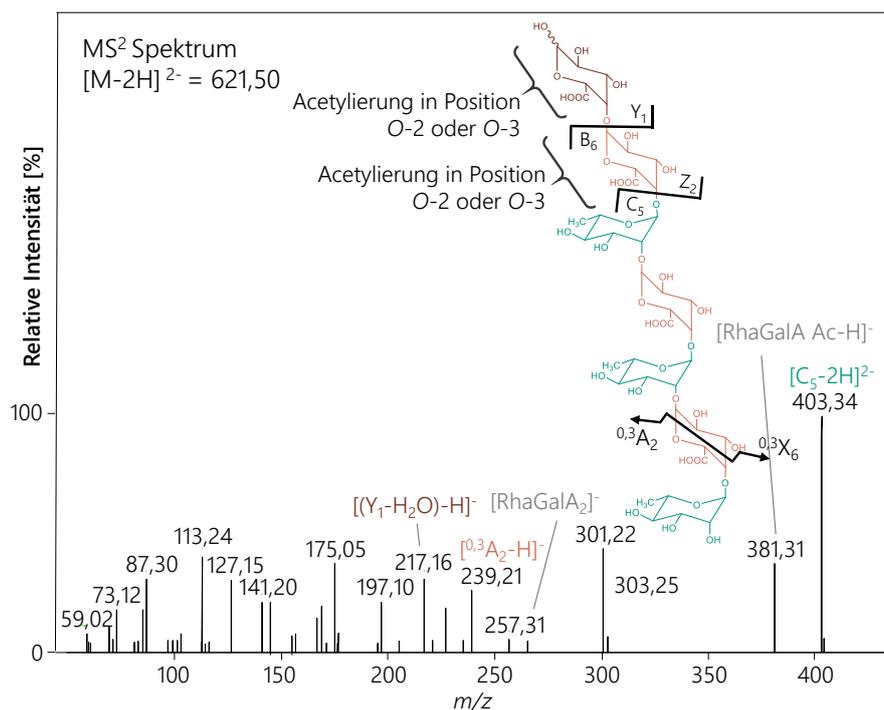


Abbildung B 15: Massenspektrum nach Tandem-Massenspektrometrie (MS²) eines Heptamers aus 3 Rhamnoseeinheiten (Rha, türkis) und 4 Galacturonsäureeinheiten (GalA, rot) mit zwei Acetylierungen an GalA 1 und 2 ausgehend vom reduzierenden Ende des Moleküls ($m/z = 621,50$ ([M-H]⁻)). Die Nomenklatur der Fragmentierung erfolgte nach Domon und Costello (1988) und Ralet *et al.* (2009)

9. Anhang

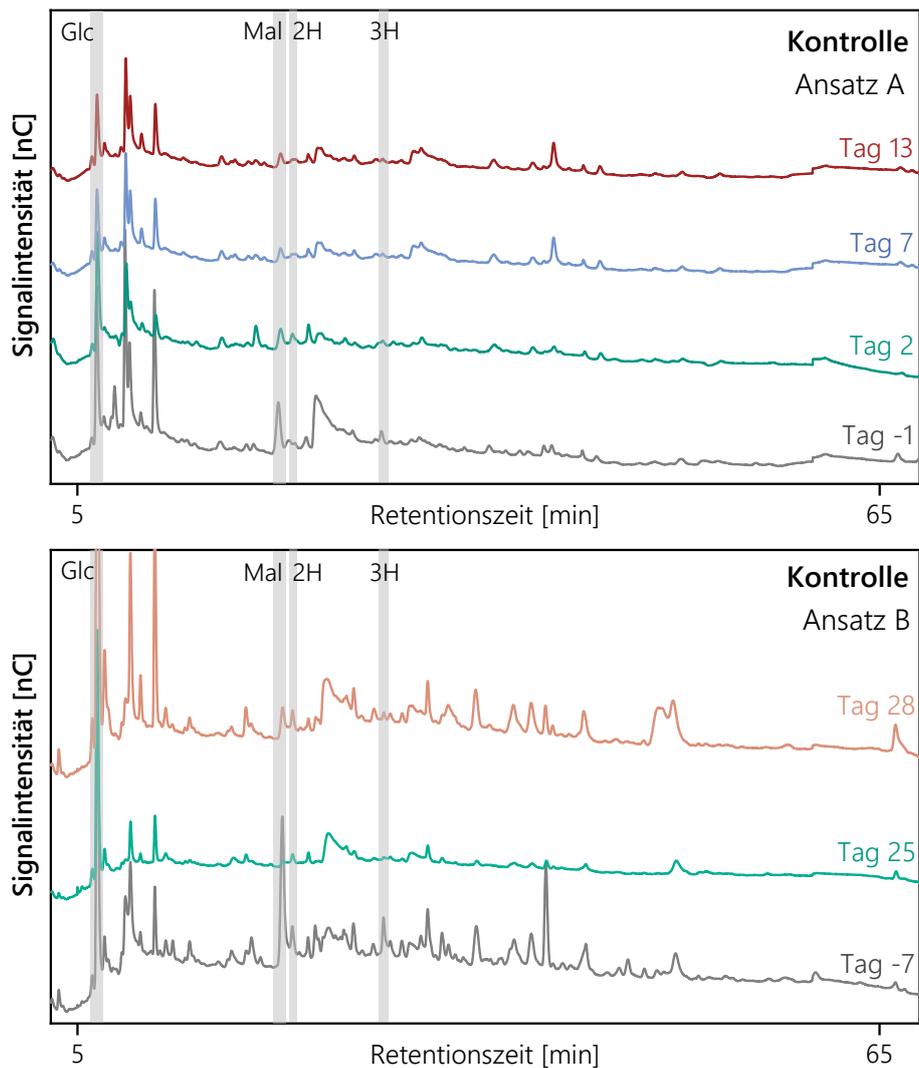


Abbildung B 16: Chromatogramme der ethanollöslichen Fraktionen der Fäzesproben der Mäuse nach Kontrollfütterung mit einem Anteil von 20 % Cellulose im Futter (ohne Pektinsupplementierung). Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigte Mono-, Di- und Oligosaccharide wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Die zugehörigen Signale sind durch graue Balken gekennzeichnet. Glc: Glucose, H_x: Hexose(-oligosaccharide), Mal: Maltose, x: Anzahl der monomeren Einheiten

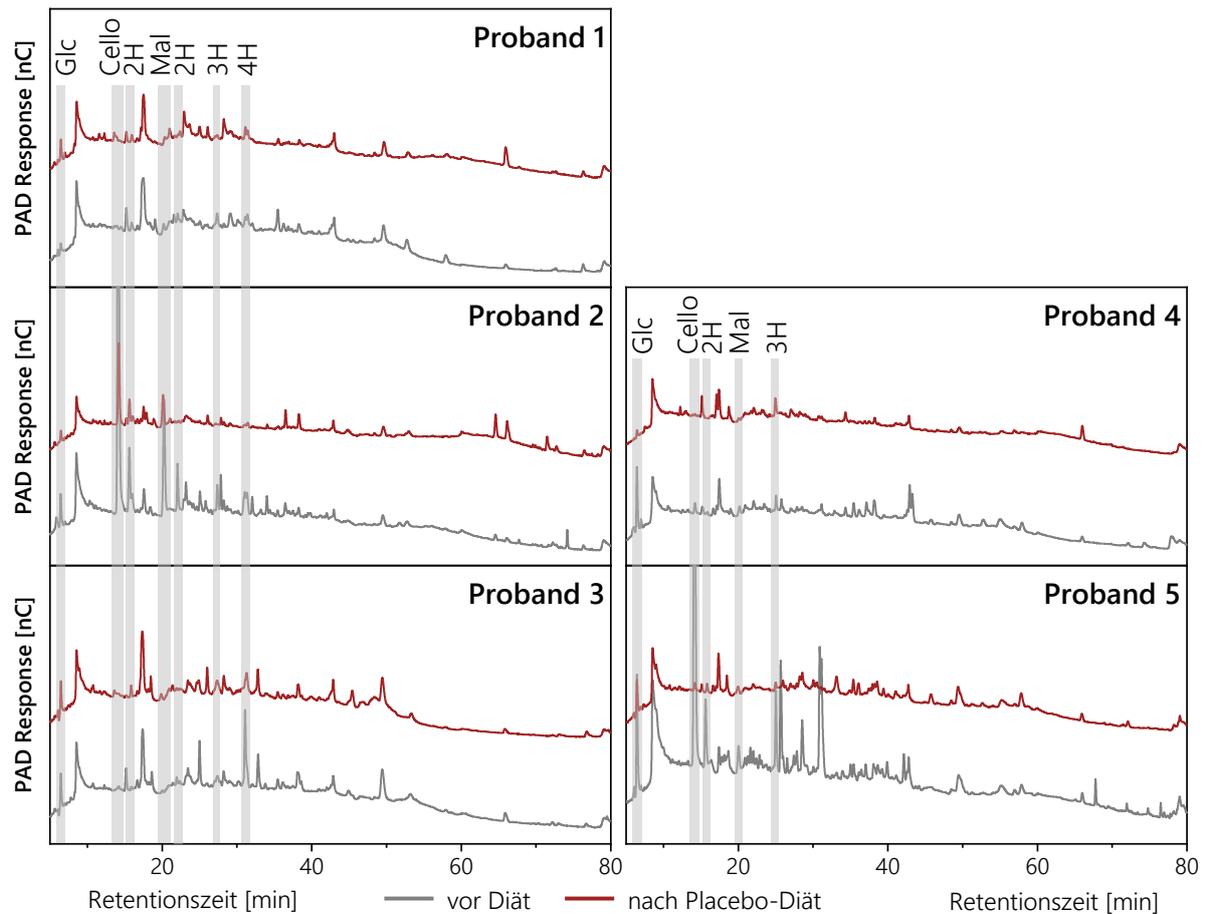


Abbildung B 17: Chromatogramme der ethanollöslichen Fraktionen der humanen Fäzesproben der Placebogruppe vor und nach der Kontrolldiät mit täglich 10 g Maltodextrin ohne Pektinsupplementierung. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigten Mono-, Di- und Oligosaccharide wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Die zugehörigen Signale sind durch graue Balken gekennzeichnet. Cello: Cellobiose, Glc: Glucose, H_x: Hexose(-oligosaccharide), Mal: Maltose, x: Anzahl der monomeren Einheiten

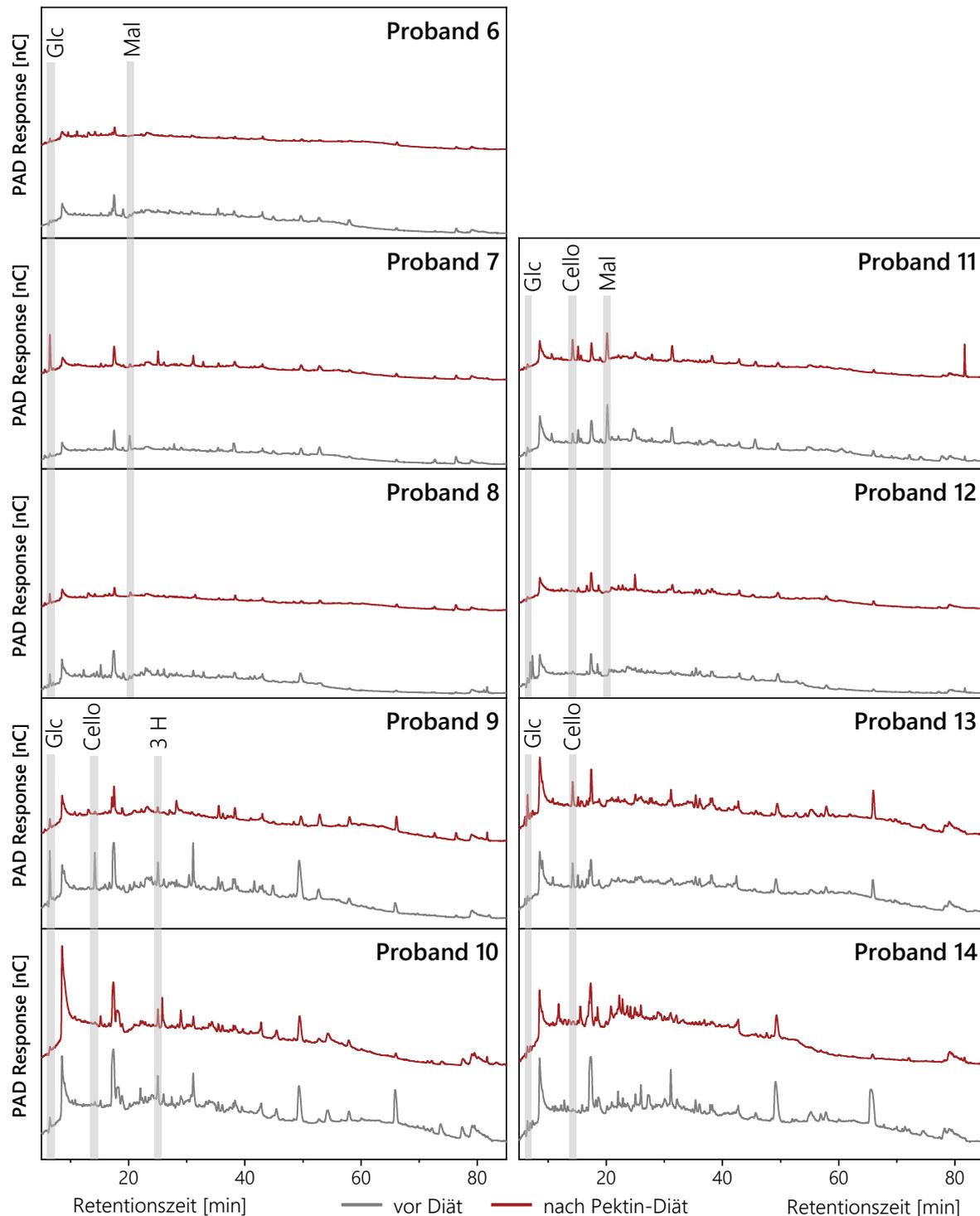


Abbildung B 18: Chromatogramme der ethanollöslichen Fraktionen der humanen Fäzesproben vor und nach einer 60-tägigen kontrollierten Diät mit einer täglichen Aufnahme von 20 g des kommerziellen Apfelpektins 2 (AP2). Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die gezeigten Mono-, Di- und Oligosaccharide wurden über gekoppelte massenspektrometrische (MS) Analyse anhand charakteristischer m/z und über ihre Retentionszeit identifiziert. Die zugehörigen Signale sind durch graue Balken gekennzeichnet. Cello: Cellobiose, Glc: Glucose, H_x: Hexose(-oligosaccharide), Mal: Maltose, x: Anzahl der monomeren Einheiten

9.2. TABELLEN

Tabelle B 1: Monosaccharidzusammensetzungen der Futterpellets für die murine *in vivo* (mol% ± Standardabweichung [%], n=3). Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA)-Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, AP: kommerzielles Apfelpektin, AP_L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, CP: kommerzielles Citruspektin, CP_L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

Futterpellets	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc
Schwefelsäurehydrolyse						
20 % Cellulose (Kontrolle)	-	-	-	-	9,7 ± 0,8	90,3 ± 0,8
15 % CP1	1,5 ± 0,1	0,4 ± 0,6	-	4,2 ± 0,3	3,5 ± 0,3	90,4 ± 0,2
15 % AP2	2,4 ± 0,1	-	-	4,8 ± 0,4	3,6 ± 0,1	89,3 ± 0,5
15 % CP_L1	0,9 ± 0,6	2,1 ± 0,1	-	5,7 ± 0,5	3,8 ± 0,1	87,5 ± 0,1
15 % AP_L	0,9 ± 1,2	1,7 ± 0,8	-	13,3 ± 0,8	3,2 ± 0,4	80,5 ± 0,5
Methanolyse + TFA-Hydrolyse						
20 % Cellulose (Kontrolle)	-	-	-	-	5,1 ± 0,3	94,9 ± 0,3
15 % CP1	-	-	-	4,7 ± 0,5	-	95,3 ± 0,5
15 % AP2	2,7 ± 0,8	-	0,8 ± 1,4	3,7 ± 0,3	-	92,8 ± 0,8
15 % CP_L1	-	2,8 ± 0,1	-	2,5 ± 0,4	-	94,7 ± 0,4
15 % AP_L	3,4 ± 0,5	4,2 ± 0,9	-	2,4 ± 0,3	-	90,0 ± 1,7

9. Anhang

Tabelle B 2: Herstellerinformationen über die Zusammensetzung der Futterpellets für die *in vivo* Fermentationsstudie im Mausversuch. tBHQ: tert-Butylhydrochinon

Anteil [%]	20 % Cellulose	5 % Pektin	15 % Pektin
Casein	20,0	20,0	20,0
L-Cystein	0,3	0,3	0,3
Cellulosepulver	20,0	15,0	5,0
Pektin	-	5,0	15,0
Maisstärke	26,7	26,7	26,7
Maltodextrin	13,2	13,2	13,2
Saccharose	10,0	10,0	10,0
Vitamin premix	1,0	1,0	1,0
Mineralstoff premix	3,5	3,5	3,5
tBHQ	0,001	0,001	0,001
Cholin bitartrat	0,3	0,3	0,3
Sojaöl	5,0	5,0	5,0
Gesamtanteil Ballaststoffe	19,9	19,3	19,1

Tabelle B 3: Extraktionsprotokolle und Ausbeuten der verschieden labortechnisch extrahierten Citruspektine bezogen auf die Trockenmasse der eingesetzten Menge an Citruschalen. Die Extraktionen wurden allesamt bei einer Temperatur von 95 °C und einem Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis von 1:25 durchgeführt. Die Pektine wurden durch das Einstellen einer Ethanolkonzentration von 80 % präzipitiert und nach dem Trocknen auf einen Partikeldurchmesser von 0,5 mm vermahlen. A: thermostabile α -Amylase (20 U/g), C: Celluclast® (8 U/g), EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, U: Ultraschallbehandlung

Citruspektin	Extraktionsmittel	Konzentration [mM]	pH	Zeit [min]	Enzym-einsatz	Quellzeit [min]	Ausbeute [%]
1	EDTA	50	-	90	-	-	21,1
2	EDTA	100	-	90	-	-	31,2
3	Wasser	-	4,2	60	-	-	8,5
4	Wasser	-	4,2	90	-	-	10,4
5	Wasser	-	4,2	240	-	-	18,9
6	Wasser	-	4,2	90	-	U / 30	13,5
7	Wasser	-	4,2	240	-	U / 30	21,6
8	Wasser	-	4,2	240	A	60	22,4
9	Wasser	-	4,2	240	C (vor)	60	20,1
10	Wasser	-	4,2	240	C (nach)	60	22,5
11	Wasser	-	1	240	-	-	14,8
12	Wasser	-	6	240	-	-	16,7
13	Citronensäure	4,5	1	240	-	60	5,5
14	Citronensäure	4,5	2	90	-	60	30,6
15	Citronensäure	4,5	2	240	-	60	33,5
16	Citronensäure	4,5	3	90	-	60	19,8
17	Citronensäure	4,5	3	240	-	60	26,3
18	Citronensäure	4,5	4,5	240	-	60	16,5
19	Citronensäure	4,5	5,2	240	-	60	16,7

9. Anhang

Tabelle B 4: Extraktionsprotokolle und Ausbeuten der verschieden labortechnisch extrahierten Apfelpektine bezogen auf die Trockenmasse der eingesetzten Menge an Apfeltrester. Die Extraktionen wurden allesamt bei einer Temperatur von 95 °C und einem Feststoff-zu-Flüssigkeitverhältnis von 1:25 durchgeführt. Die Pektine wurden durch das Einstellen einer Ethanolkonzentration von 80 % präzipitiert und nach dem Trocknen auf einen Partikeldurchmesser von 0,5 mm vermahlen. A: thermostabile α -Amylase (20 U/g), C: Celluclast® (8 U/g), EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, U: Ultraschallbehandlung

Apfel-pektin	Extraktinsmittel	Konzentration [mM]	pH	Zeit [min]	Enzym-einsatz	Quellzeit [min]	Ausbeute [%]
1	EDTA	50	-	90	-	-	12,5
2	EDTA	100	-	90	-	-	14,8
3	Wasser	-	4,2	60	-	-	5,4
4	Wasser	-	4,2	90	-	-	9,1
5	Wasser	-	4,2	240	-	-	13,9
6	Wasser	-	4,2	90	-	U / 30	11,2
7	Wasser	-	4,2	240	-	U / 30	14,4
8	Wasser	-	4,2	240	A	60	14,4
9	Wasser	-	4,2	240	C (vor)	60	16,2
10	Wasser	-	4,2	240	C (nach)	60	18,1
11	Wasser	-	1	240	-	-	5,9
12	Wasser	-	6	240	-	-	7,3
13	Citronensäure	4,5	1	240	-	60	3,6
14	Citronensäure	4,5	2	90	-	60	15,1
15	Citronensäure	4,5	2	240	-	60	15,8
16	Citronensäure	4,5	3	90	-	60	12,9
17	Citronensäure	4,5	3	240	-	60	15,9
18	Citronensäure	4,5	4,5	240	-	60	6,5
19	Citronensäure	4,5	5,2	240	-	60	10,5

Tabelle B 5: Herstellerinformationen über die Cellulasen und die α -Amylase der Firma Erbslöh Geisenheim GmbH. C: Cellulase

Bezeichnung	Enzym	Herkunft
C1	Cellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
C2	Cellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
C3	Cellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
C4	Cellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
C5	Cellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
C6	Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>
C7	Cellulase	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>
-	α -Amylase	<i>Aspergillus niger</i>

Tabelle B 6: Extraktionsprotokolle und Ausbeuten der verschiedenen labortechnisch extrahierten Citruspektine bezogen auf die Trockenmasse der eingesetzten Menge an Citruschalen. Die Extraktionen wurden allesamt bei einer Temperatur von 95 °C und über eine Zeit von 90 min in 4,5 mM Citronensäurelösung und einem Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis von 1:25 durchgeführt. Die Extrakte wurden nach der Extraktion unter dem Einsatz verschiedener Cellulasen (s. Tabelle B 5 im Anhang) und ohne Enzymeinsatz über 60 min bei 40 °C nachinkubiert. Die Pektine wurden durch das Einstellen einer Ethanolkonzentration von 80 % präzipitiert und nach dem Trocknen auf einen Partikeldurchmesser von 0,5 mm vermahlen

Citruspektin	Enzymeinsatz	Enzymmenge	Ausbeute [%]
20	-	-	16,4
21	Celluclast	8 U/g	20,5
22	C1	10 mg/g	17,4
23	C2	10 mg/g	23,0
24	C3	10 mg/g	17,1
25	C4	10 mg/g	23,9
26	C5	10 mg/g	30,6
27	C6	10 mg/g	22,2
28	C7	10 mg/g	16,3

9. Anhang

Tabelle B 7: Extraktionsprotokolle und Ausbeuten der verschieden labortechnisch extrahierten Apfelpektine bezogen auf die Trockenmasse der eingesetzten Menge an Apfeltrester. Die Extraktionen wurden allesamt bei einer Temperatur von 95 °C und über eine Zeit von 240 min in vollentsalztem Wasser und einem Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis von 1:25 durchgeführt. Die Extrakte wurden nach der Extraktion unter dem Einsatz verschiedener Cellulasen (s. Tabelle B 5 im Anhang) und ohne Enzymeinsatz über 60 min bei 40 °C nachinkubiert. Die Pektine wurden durch das Einstellen einer Ethanolkonzentration von 80 % präzipitiert und nach dem Trocknen auf einen Partikeldurchmesser von 0,5 mm vermahlen

Apfelpektin	Enzymeinsatz	Enzymmenge	Ausbeute [%]
20	-	-	16,1
21	Celluclast	8 U/g	19,9
22	C1	10 mg/g	14,2
23	C2	10 mg/g	15,5
24	C3	10 mg/g	15,8
25	C4	10 mg/g	17,8
26	C5	10 mg/g	18,4
27	C6	10 mg/g	12,6
28	C7	10 mg/g	16,7

Tabelle B 8: Anteile der paritell methylierten Alditolacetate (PMAA, in mol% \pm Range/2, n=2) aus den Daten der Methylierungsanalyse der in dieser Arbeit untersuchten sechs kommerziellen und drei labortechnisch extrahierten Pektine. Die Analyse der PMAA erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) mit massenspektrometrischem Detektor (MS) und Flammenionisationsdetektor (FID). Ara: Arabinose, AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP.L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, Xyl: Xylose, -: nicht detektiert

Pektine	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP	CP.L1	CP.L2	AP.L
t-Araf	11,0 \pm 0,9	5,5 \pm 2,0	11,2 \pm 0,4	9,4 \pm 1,9	7,4 \pm 0,8	17,3 \pm 0,8	20,4 \pm 1,3	17,1 \pm 0,2	14,7 \pm 0,4
1,5-Araf / 1,4-Arap	15,9 \pm 0,1	13,3 \pm 0,3	16,1 \pm 0,5	17,4 \pm 1,6	11,0 \pm 1,0	16,7 \pm 0,7	43,2 \pm 1,4	26,1 \pm 0,7	34,0 \pm 0,8
1,3,5-Araf	1,4 \pm 0,1	-	-	3,6 \pm 1,2	0,9 \pm 0,1	5,1 \pm 0,1	8,8 \pm 0,3	4,8 \pm 0,2	7,1 \pm 0,4
1,2,5-Araf	2,2 \pm 1,2	2,7 \pm 1,0	2,0 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1
1,3-Araf	-	-	-	-	-	2,2 \pm 0,1	-	-	-
Σ Ara	30,5	32,2	29,3	31,1	20,7	43,3	75,9	51,2	57,7
t-Galp	9,2 \pm 2,4	11,4 \pm 1,5	9,7 \pm 0,6	7,9 \pm 0,1	8,7 \pm 0,7	10,2 \pm 0,4	2,7 \pm 0,1	4,8 \pm 0,3	6,2 \pm 0,1
1,3-Galp	-	-	-	-	-	2,7 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3
1,4-Galp	26,1 \pm 8,6	31,7 \pm 5,7	29,0 \pm 1,5	13,9 \pm 1,3	25,6 \pm 1,7	11,7 \pm 1,7	11,6 \pm 0,5	26,9 \pm 0,1	11,6 \pm 0,1
1,6-Galp	-	-	-	-	-	7,2 \pm 0,1	-	-	-
1,3,6-Galp	-	-	-	-	-	3,5 \pm 0,3	-	-	0,9 \pm 0,1
Σ Gal	35,3	43,1	38,7	21,8	34,3	31,8	15,3	33,5	19,3
1,2-Rhap	19,5 \pm 4,8	12,7 \pm 0,2	16,8 \pm 0,4	11,2 \pm 0,8	8,8 \pm 0,5	9,4 \pm 0,4	6,2 \pm 0,1	10,2 \pm 0,3	6,3 \pm 0,6
1,2,4-Rhap	8,3 \pm 0,5	5,1 \pm 0,6	5,8 \pm 0,2	6,1 \pm 0,7	5,3 \pm 0,1	8,7 \pm 0,4	2,6 \pm 0,1	5,0 \pm 0,2	6,3 \pm 0,1
Σ Rha	27,8	17,8	22,6	17,3	14,1	18,1	8,8	15,3	12,5
t-Xylp	-	-	-	6,6 \pm 0,6	5,5 \pm 0,4	-	-	-	5,5 \pm 1,2
1,4-Xylp	-	-	-	2,1 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1	-	-	-	2,3 \pm 0,4

9. Anhang

Σ Xyl	-	-	-	9,0	7,3	-	-	-	7,8
t-Glcp	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,1	-	-	-
1,4-Glcp	6,5 ± 1,3	17,6 ± 6,6	9,3 ± 1,5	20,8 ± 1,3	23,5 ± 0,7	2,9 ± 0,1	-	-	1,7 ± 0,1
Σ Glc	6,5	17,6	9,3	20,8	23,5	3,2	-	-	1,7

Tabelle B 9: Anteile der paritell methylierten Alditolacetate (PMAA, in mol% ± Range/2, n=2) aus den Daten der Methylierungsanalyse mit vorheriger Carboxylreduktion der drei in dieser Arbeit untersuchten Apfelpektine sowie des kommerziellen Zuckerrübenpektins (SBP). Die Analyse der PMAA erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) mit massenspektrometrischem Detektor (MS) und Flammenionisationsdetektor (FID). Ara: Arabinose, AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, f: Furanose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose, -: nicht detektiert

PMAA	AP1	AP2	AP.L	SBP
t-Araf	7,0 ± 1,5	6,1 ± 0,9	12,1 ± 0,3	13,9 ± 0,6
1,5-Araf / 1,4-Arap	12,9 ± 1,4	8,9 ± 0,4	28,1 ± 0,8	13,4 ± 0,6
1,3,5-Araf	2,7 ± 0,9	0,7 ± 0,1	5,8 ± 0,3	4,1 ± 0,1
1,2,5-Araf	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1
1,3-Galp	-	-	-	1,8 ± 0,1
Σ Ara	23,1	16,9	47,6	34,7
t-Galp	5,9 ± 0,2	7,1 ± 0,3	5,2 ± 0,1	8,2 ± 0,3
1,3-Galp	-	-	1,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2
1,4-Galp	10,3 ± 0,8	20,9 ± 2,3	9,6 ± 0,1	9,4 ± 1,4
1,6-Galp	-	-	-	5,8 ± 0,0
Σ Gal	16,2	28,0	16,0	25,6
1,2-Rhap	8,3 ± 0,4	7,1 ± 0,1	5,2 ± 0,4	7,6 ± 0,3
1,2,4-Rhap	4,5 ± 0,4	4,3 ± 0,2	5,2 ± 0,1	7,0 ± 0,3
Σ Rha	12,8	11,4	10,3	14,5
t-GalAp	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
1,4-GalAp	22,0 ± 1,3	15,2 ± 3,5	14,2 ± 0,3	13,7 ± 0,5
1,3,4-GalAp	2,7 ± 0,1	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,1	2,7 ± 0,2
Σ GalA	25,8	18,7	15,3	17,5
t-Xylp	5,1 ± 0,3	4,5 ± 0,5	4,5 ± 1,0	-

1,4-Xylp	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,4	-
Σ Xyl	6,7	6,0	6,4	-
t-Glcp	-	-	-	0,3 ± 0,1
1,4-Glcp	15,4 ± 0,7	19,1 ± 0,3	1,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1
1,3,6-Glcp	-	-	0,8 ± 0,1	2,8 ± 0,2
Σ Glc	15,4	19,1	2,2	5,4
t-GlcAp	-	-	-	2,2

Tabelle B 10: Herstellerinformationen über die Standardsubstanzen der für die enzymatische Umsetzung mit Driselase und Viscozyme L eingesetzten Pektinstruktureinheiten

Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Herkunft
Lineares Arabinan	Linear 1,5- α -L-Arabinan	Megazyme	Zuckerrübe
Verzweigtes Arabinan	Arabinan	Megazyme	Zuckerrübe
Galactan	Pectic Galactan	Megazyme	Kartoffel
Rhamnogalacturonan	Rhamnogalacturonan	Megazyme	Kartoffel

Tabelle B 11: Gravimetrische Bestimmung der nicht fermentierten Pektinpolysaccharide nach *in vitro* Fermentation der sechs kommerziellen Pektine und der drei labortechnisch extrahierten Pektine über verschiedene Zeiten und je einer Blindprobe ohne Zugabe von humanen Fäzesproben. Alle gezeigten Werte wurden um die Werte der gravimetrischen Bestimmung von humanen Fäzesproben ohne zugegebene Pektine korrigiert und repräsentieren die Mittelwerte in mg \pm Standardabweichung [%] aus drei biologischen Replikaten. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, CP.L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin

Pektine	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP	CP.L1	CP.L2	AP.L
Blindprobe	64,3 \pm 4,1	49,2 \pm 1,3	47,1 \pm 1,3	50,0 \pm 5,2	49,2 \pm 0,9	48,9 \pm 5,4	46,6 \pm 0,6	50,4 \pm 0,7	45,8 \pm 1,6
0 h	49,0 \pm 3,3	46,3 \pm 1,8	43,4 \pm 0,7	45,3 \pm 2,1	48,5 \pm 1,2	39,3 \pm 5,0	45,3 \pm 2,6	49,5 \pm 1,1	43,6 \pm 1,4
4 h	11,8 \pm 2,6	5,9 \pm 3,8	5,2 \pm 0,4	5,4 \pm 1,2	10,2 \pm 6,3	10,3 \pm 1,3	1,4 \pm 1,0	4,4 \pm 1,6	5,2 \pm 0,3
24 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-

9. Anhang

Tabelle B 12: Monosaccharidzusammensetzungen der kommerziellen Pektine und der labortechnisch extrahierten Pektine sowie der nicht fermentierten Polysaccharide (RP) nach *in vitro* Fermentation über verschiedene Zeiten (mol% ± Standardabweichung [%], n=3 (biologische Replikate)). Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Die Extraktionen der labortechnisch extrahierten Pektine erfolgten nach den in Kapitel 8.1. beschriebenen Extraktionsprotokollen. AP: kommerzielles Apfelpektin, AP.L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, Ara: Arabinose, CP: kommerzielles Citruspektin, CP.L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, GlcA: Glucuronsäure, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	GlcA	Man
CP1	14,1 ± 0,5	3,6 ± 0,1	7,8 ± 0,1	74,2 ± 0,4	0,7 ± 0,1	-	-	-
RP 10 min	7,7 ± 0,2	2,1 ± 0,5	5,8 ± 0,8	84,3 ± 3,6	-	-	-	-
RP 4 h	1,5 ± 0,4	0,9 ± 0,1	5,2 ± 1,7	92,4 ± 1,9	-	-	-	-
RP 24 h	12,7 ± 0,9	3,1 ± 0,3	36,0 ± 3,7	37,6 ± 2,7	1,0 ± 0,3	6,1 ± 1,2	1,0 ± 0,4	2,6 ± 0,6
RP 48 h	17,6 ± 1,2	3,8 ± 0,1	27,2 ± 2,6	28,6 ± 2,2	1,5 ± 0,4	14,1 ± 2,5	2,1 ± 0,9	5,2 ± 1,3
CP2	16,0 ± 1,0	3,8 ± 0,4	7,8 ± 0,7	60,9 ± 1,4	1,0 ± 0,1	10,2 ± 2,2	-	-
RP 10 min	14,3 ± 4,9	3,2 ± 1,2	6,5 ± 0,7	73,4 ± 7,0	1,1 ± 0,1	-	-	-
RP 4 h	3,6 ± 0,9	2,2 ± 0,6	7,8 ± 0,3	84,3 ± 2,3	2,0 ± 0,5	-	-	-
RP 24 h	16,3 ± 0,5	4,5 ± 0,1	12,7 ± 1,4	46,4 ± 2,4	1,5 ± 0,8	11,9 ± 0,1	2,5 ± 0,7	4,1 ± 1,3
RP 48 h	22,0 ± 1,5	4,4 ± 0,9	13,4 ± 5,4	30,6 ± 4,4	1,0 ± 0,1	6,7 ± 1,4	-	-
CP3	17,1 ± 0,8	5,4 ± 0,3	8,8 ± 0,5	61,2 ± 0,9	1,0 ± 0,1	6,7 ± 1,4	-	-
RP 10 min	3,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,3 ± 0,7	92,3 ± 0,9	-	-	-	0,6 ± 0,1
RP 4 h	3,2 ± 0,7	1,7 ± 0,1	7,8 ± 0,4	86,2 ± 0,6	1,0 ± 0,3	-	-	-
RP 24 h	27,6 ± 1,8	5,1 ± 1,1	22,2 ± 0,7	9,0 ± 4,3	1,9 ± 1,1	21,4 ± 3,2	2,5 ± 1,1	10,4 ± 0,9
RP 48 h	28,2 ± 1,8	4,2 ± 0,8	22,2 ± 0,5	6,0 ± 1,4	2,0 ± 1,0	24,9 ± 2,3	2,2 ± 1,3	10,4 ± 2,0

AP1	19,0 ± 0,7	3,9 ± 2,3	9,7 ± 0,5	54,1 ± 3,6	7,2 ± 0,3	6,3 ± 0,3	-	-
RP 10 min	11,0 ± 1,7	2,8 ± 0,3	8,0 ± 0,8	71,2 ± 3,8	5,6 ± 0,6	1,2 ± 0,4	-	-
RP 4 h	3,4 ± 0,8	2,1 ± 0,4	8,3 ± 1,5	77,1 ± 3,4	9,1 ± 1,9	-	-	-
RP 24 h	12,6 ± 1,7	3,1 ± 0,6	25,7 ± 5,8	37,1 ± 10,4	3,2 ± 2,3	10,7 ± 2,5	2,1 ± 1,6	5,4 ± 0,9
RP 48 h	20,8 ± 1,0	3,2 ± 0,4	25,0 ± 0,3	17,5 ± 5,2	1,5 ± 0,8	19,3 ± 2,0	3,4 ± 2,4	9,3 ± 0,6
AP2	20,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1	8,7 ± 0,1	52,4 ± 1,1	5,1 ± 0,1	9,1 ± 2,1	-	-
RP 10 min	16,3 ± 1,1	2,4 ± 0,1	6,2 ± 0,7	70,0 ± 1,8	3,7 ± 0,2	0,4 ± 0,7	-	1,0 ± 0,1
RP 4 h	4,1 ± 1,2	2,0 ± 1,5	8,7 ± 1,7	76,9 ± 5,4	8,3 ± 2,0	-	-	-
RP 24 h	10,9 ± 2,0	2,4 ± 0,3	13,4 ± 1,0	55,8 ± 3,0	4,2 ± 0,8	8,1 ± 1,6	1,5 ± 0,6	3,9 ± 0,9
RP 48 h	12,8 ± 0,8	2,1 ± 0,3	11,8 ± 0,7	55,3 ± 1,3	2,8 ± 0,7	9,9 ± 1,0	1,5 ± 0,3	3,9 ± 0,8
SBP	21,9 ± 0,3	13,9 ± 0,1	14,0 ± 0,1	45,7 ± 0,4	0,5 ± 0,1	2,5 ± 0,4	1,3 ± 0,2	-
RP 10 min	18,6 ± 0,7	10,0 ± 0,8	11,1 ± 0,3	57,2 ± 1,5	-	-	2,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2
RP 4 h	18,0 ± 0,7	7,1 ± 1,3	18,9 ± 4,0	53,4 ± 8,3	0,7 ± 0,1	-	1,9 ± 0,2	-
RP 24 h	17,1 ± 1,9	5,0 ± 1,2	32,4 ± 1,7	35,1 ± 5,4	0,6 ± 0,1	5,8 ± 2,4	1,8 ± 0,7	2,3 ± 1,0
RP 48 h	17,5 ± 0,5	5,6 ± 0,5	29,3 ± 2,5	29,4 ± 0,6	0,7 ± 0,2	10,7 ± 1,3	2,9 ± 0,5	4,0 ± 0,7
CP-L1	14,3 ± 0,1	27,6 ± 0,4	5,7 ± 0,1	52,4 ± 0,2	-	-	-	-
RP 10 min	2,9 ± 0,6	6,0 ± 0,7	1,8 ± 0,1	89,3 ± 1,3	-	-	-	-
RP 4 h	10,9 ± 0,6	6,9 ± 1,4	13,3 ± 4,3	68,8 ± 6,1	-	-	-	-
RP 24 h	29,2 ± 6,0	4,3 ± 0,6	24,3 ± 2,1	16,3 ± 8,7	0,9 ± 0,5	17,6 ± 6,7	1,7 ± 0,3	5,7 ± 3,2

9. Anhang

RP 48 h	29,8 ± 7,7	3,2 ± 0,6	25,5 ± 2,5	8,4 ± 3,4	0,9 ± 0,1	22,2 ± 5,2	1,7 ± 0,5	8,3 ± 2,4
CP-L2	20,4 ± 1,3	12,5 ± 0,9	7,2 ± 0,4	59,9 ± 2,5	-	-	-	-
RP 10 min	4,4 ± 0,6	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,2	91,1 ± 0,7	-	-	-	-
RP 4 h	6,5 ± 1,3	4,4 ± 0,6	10,5 ± 1,8	78,6 ± 2,4	-	-	-	-
RP 24 h	22,0 ± 6,4	5,1 ± 1,3	26,7 ± 2,1	24,1 ± 3,4	1,0 ± 0,1	13,6 ± 3,6	2,7 ± 0,4	4,6 ± 1,5
RP 48 h	23,9 ± 6,3	4,3 ± 1,2	26,2 ± 1,0	18,4 ± 4,6	1,0 ± 0,2	17,1 ± 4,5	2,8 ± 0,5	6,3 ± 1,6
AP-L	18,9 ± 0,7	27,4 ± 1,5	8,6 ± 0,5	35,6 ± 0,4	7,9 ± 0,1	0,1 ± 1,5	-	0,6 ± 0,8
RP 10 min	5,6 ± 0,1	7,5 ± 1,0	3,4 ± 0,1	79,5 ± 1,8	3,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	-	0,7 ± 0,1
RP 4 h	9,7 ± 1,3	6,6 ± 0,7	20,1 ± 0,6	38,7 ± 0,4	23,6 ± 1,8	-	-	1,3 ± 0,2
RP 24 h	21,9 ± 6,2	4,6 ± 0,9	24,9 ± 2,2	19,2 ± 6,3	1,7 ± 0,1	16,5 ± 5,5	1,6 ± 0,5	9,7 ± 2,1
RP 48 h	24,9 ± 6,1	3,5 ± 0,4	25,6 ± 2,2	13,7 ± 5,1	0,9 ± 0,1	19,5 ± 5,5	1,9 ± 0,7	10,0 ± 1,9

Tabelle B 13: Monosaccharidzusammensetzungen (mol% \pm Standardabweichung [%], n=3 (biologische Replikate)) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Kontrollproben ohne Pektinzugabe nach *in vitro* Fermentation bzw. Inkubation über verschiedene Zeiten. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, GlcA: Glucuronsäure, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	GlcA	Man
Kontrollprobe: Medium								
RP 10 min	4,8 \pm 2,7	0,8 \pm 1,2	0,3 \pm 0,4	7,5 \pm 3,5	0,3 \pm 0,4	25,1 \pm 2,6	-	61,1 \pm 6,7
RP 4 h	0,8 \pm 0,7	0,2 \pm 0,4	0,2 \pm 0,3	-	-	24,1 \pm 2,7	-	74,8 \pm 1,7
RP 24 h	-	-	-	1,5 \pm 0,1	-	27,0 \pm 2,7	-	71,5 \pm 2,7
RP 48 h	1,3 \pm 2,3	1,4 \pm 1,8	0,3 \pm 0,5	1,6 \pm 2,7	-	24,5 \pm 3,1	-	70,9 \pm 5,9
Kontrollprobe: Medium + Fäzes								
RP 10 min	12,1 \pm 1,2	2,6 \pm 0,3	2,5 \pm 0,6	-	2,8 \pm 0,3	9,2 \pm 1,1	-	70,8 \pm 2,1
RP 4 h	45,4 \pm 1,9	11,8 \pm 5,0	9,6 \pm 1,2	2,5 \pm 4,3	4,2 \pm 0,9	19,4 \pm 4,5	-	7,2 \pm 2,1
RP 24 h	39,0 \pm 1,7	5,4 \pm 0,3	12,8 \pm 0,5	-	4,8 \pm 0,7	32,1 \pm 2,5	-	5,8 \pm 0,5
RP 48 h	38,6 \pm 1,7	5,5 \pm 0,6	13,4 \pm 0,4	-	5,0 \pm 0,9	32,2 \pm 1,5	-	5,2 \pm 0,6

9. Anhang

Tabelle B 14: Anteile der paritell methylierten Alditolacetate (PMAA, in mol% \pm Range/2, n=2) aus den Daten der Methylierungsanalyse der nicht fermentierten Polysaccharide nach *in vitro* Fermentation über 10 min der sechs kommerziellen Pektine. Die Analyse der PMAA erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) mit massenspektrometrischem Detektor (MS) und Flammenionisationsdetektor (FID). Ara: Arabinose, AP: kommerzielles Apfelppektin, CP: kommerzielles Citruspektin, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, Xyl: Xylose, -: nicht detektiert

Pektine	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP
t-Araf	10,4 \pm 0,5	11,1 \pm 1,5	9,6 \pm 0,6	6,8 \pm 0,1	8,0 \pm 0,9	15,8 \pm 0,1
1,5-Araf / 1,4-Arap	25,2 \pm 0,8	9,8 \pm 0,5	20,0 \pm 1,3	17,7 \pm 0,3	7,7 \pm 0,3	8,9 \pm 0,5
1,3,5-Araf	-	-	-	-	-	4,0 \pm 0,3
1,2,5-Araf	-	-	-	-	-	1,5 \pm 0,1
1,3-Araf	-	-	-	-	-	10,1 \pm 2,5
Σ Ara	35,6	20,9	29,6	24,5	15,7	40,4
t-Galp	5,4 \pm 0,6	7,6 \pm 0,6	8,3 \pm 0,3	8,7 \pm 0,4	9,3 \pm 0,9	10,6 \pm 0,2
1,3-Galp	-	-	-	-	-	2,0 \pm 0,1
1,4-Galp	20,4 \pm 1,2	7,3 \pm 1,4	10,1 \pm 0,2	9,3 \pm 1,1	10,0 \pm 0,3	6,2 \pm 0,1
1,6-Galp	-	-	-	-	-	4,6 \pm 0,1
Σ Gal	25,7	14,9	18,4	18,0	19,3	23,4
1,2-Rhap	18,1 \pm 1,8	17,9 \pm 5,5	24,8 \pm 0,1	19,2 \pm 1,5	14,1 \pm 2,1	12,7 \pm 1,8
1,2,4-Rhap	6,3 \pm 0,8	5,5 \pm 0,3	6,1 \pm 1,5	9,2 \pm 0,4	6,1 \pm 0,1	12,3 \pm 1,1
Σ Rha	27,7	23,4	30,9	28,3	20,1	25,0
t-Xylp	-	-	-	12,8 \pm 1,7	14,8 \pm 1,0	-
1,4-Xylp	-	7,9 \pm 0,8	-	5,5 \pm 0,3	6,2 \pm 0,8	-
Σ Xyl	-	7,9	-	18,3	20,9	-
t-Glcp	-	-	-	-	-	1,5 \pm 0,1
1,4-Glcp	14,3 \pm 1,6	32,9 \pm 1,5	21,2 \pm 3,6	10,9 \pm 1,7	23,9 \pm 0,2	9,7 \pm 0,2
Σ Glc	14,3	32,9	21,2	10,9	23,9	11,3

Tabelle B 15: Anteile der paritell methylierten Alditolacetate (PMAA, in mol% \pm Range/2, n=2) aus den Daten der Methylierungsanalyse der nicht fermentierten Polysaccharide nach *in vitro* Fermentation über 4 h der sechs kommerziellen Pektine. Die Analyse der PMAA erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) mit massenspektrometrischem Detektor (MS) und Flammenionisationsdetektor (FID). Ara: Arabinose, AP: kommerzielles Apfelpektin, CP: kommerzielles Citruspektin, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, Xyl: Xylose, -: nicht detektiert

Pektine	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP
t-Araf	7,3 \pm 1,1	7,3 \pm 0,1	5,5 \pm 0,4	5,2 \pm 0,4	6,2 \pm 0,5	12,4 \pm 3,0
1,5-Araf / 1,4-Arap	17,6 \pm 0,3	26,7 \pm 1,8	25,6 \pm 6,1	16,2 \pm 2,5	19,4 \pm 0,6	17,0 \pm 3,5
1,3,5-Araf	-	-	-	-	-	-
1,2,5-Araf	-	-	-	-	-	1,2 \pm 0,2
1,3-Araf	-	-	-	-	-	-
Σ Ara	24,9	34,0	31,1	21,4	25,6	30,6
t-Galp	6,2 \pm 0,1	3,3 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	5,6 \pm 1,1	7,2 \pm 0,3	18,5 \pm 1,0
1,3-Galp	-	-	-	-	-	2,0 \pm 0,5
1,4-Galp	1,7 \pm 0,7	3,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3	1,7 \pm 0,1	10,7 \pm 0,3
1,6-Galp	-	-	-	-	-	-
Σ Gal	7,9	6,6	2,0	6,7	8,9	31,2
1,2-Rhap	15,9 \pm 0,4	12,1 \pm 1,3	7,6 \pm 2,0	10,4 \pm 3,6	14,9 \pm 1,2	14,0 \pm 0,9
1,2,4-Rhap	2,8 \pm 0,4	2,1 \pm 0,3	0,5 \pm 0,1	4,0 \pm 3,3	3,8 \pm 0,1	15,0 \pm 2,0
Σ Rha	18,8	14,1	8,1	14,4	18,7	29,0
t-Xylp	8,1 \pm 0,6	-	8,0 \pm 5,6	17,9 \pm 7,5	12,2 \pm 4,1	-
1,4-Xylp	11,6 \pm 1,7	-	28,4 \pm 10,6	20,8 \pm 9,3	9,1 \pm 1,1	-
Σ Xyl	19,8	-	36,4	38,7	21,3	-
t-Glcp	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,2
1,4-Glcp	28,0 \pm 1,7	42,5 \pm 0,4	21,7 \pm 8,5	18,5 \pm 4,3	24,8 \pm 1,2	7,9 \pm 2,5
Σ Glc	28,0	42,5	21,7	18,5	24,8	8,6
1,4-Manp	0,6 \pm 0,1	2,7 \pm 0,6	0,7 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2
Σ Man	0,6	2,7	0,7	0,4	0,7	0,6

9. Anhang

Tabelle B 16: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol, n=1) der präparativ isolierten intermediären Spaltprodukte nach *in vitro* Fermentation der kommerziellen Pektine über verschiedene Zeiten. Die Isolierung der Verbindungen erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD) gekoppelt mit einem Fraktionssammler. Die Hydrolyse der Di- und Oligosaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels HPAEC-PAD. Die Chromatogramme mit Kennzeichnung der fraktionierten Signale sind in Abbildung B 10 dargestellt. AP: kommerzielles Apfelpektin, Ara: Arabinose, CP: kommerzielles Citruspektin, Gal_x: Galactose(-oligosaccharid), GalA_x: Galacturonsäure(-oligosaccharid), Glc: Glucose, Man: Mannose, Rha_x: Rhamnose(-oligosaccharid), RT: Retentionszeit, SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, x: Anzahl der monomeren Einheiten, Xyl: Xylose

			RT [min]	[M+Li] ⁺	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	Man
AP1											
10 min											
1	Gal ₂	349	72,7	6,1	-	4,1	-	17,2	-		
2	Gal ₃	511	55,3	-	-	-	7,5	37,2	-		
3	Gal ₄	673	91,9	1,8	-	-	1,4	-	-		
4	Gal ₅	835	59,0	6,4	-	-	8,7	22,3	-		
5	GalA ₄	-	4,4	12,3	2,6	60,6	5,0	12,1	3,0		
CP1											
4 h											
1	GalA	201	-	-	-	79,3	2,7	18,0	-		
2	GalA ₂	-	2,2	2,2	1,9	67,1	-	24,3	2,2		
3	GalA ₃	-	-	-	-	93,4	2,4	4,2	-		
4	GalA ₄	-	2,2	2,2	1,9	67,1	2,2	24,3	-		
CP1											
24 h											
1	GalA	201	-	-	-	100,0	-	-	-		
2	GalA ₂	-	-	-	-	79,7	-	20,3	-		
SBP											
48 h											
1	Rha ₂ - GalA	493	3,7	1,5	59,9	21,7	2,2	10,7	-		
2	Gal- Rha ₂ - GalA		23,0	1,3	51,0	19,7	-	5,0	-		
3	Rha ₂ - GalA ₂		1,9	1,8	61,7	28,3	-	6,2	-		

Tabelle B 17: Zusammenfassung der identifizierten intermediären Spaltprodukte nach *in vitro* Fermentation der sechs kommerziellen und drei labortechnisch extrahierten Pektine nach verschiedenen Fermentationszeiten. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD) gekoppelt mit einem massenspektrometrischen (MS) Detektor sowie mit Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) und MS² Detektion. Die Mono-, Di- und Oligosaccharide wurden über ihre Retentionszeit sowie *m/z* und entsprechende Fragmentierungsmuster identifiziert. Zusätzlich wurde für die nachgewiesenen Kohlenhydrate nach HPAEC-PAD/MS Analyse eine präparative Isolierung mit anschließender Analyse der Monosaccharidzusammensetzungen durchgeführt, um die Identität zu bestätigen. Ac_x: (Mehrfach-)Acetylierung, AP: kommerzielles Apfelpektin, AP_L: labortechnisch extrahiertes Apfelpektin, Ara: Arabinose, CP: kommerzielles Citruspektin, CP_L: labortechnisch extrahiertes Citruspektin, Gal_x: Galactose(-oligosaccharide), GalA_x: Galacturonsäure(-oligosaccharide), Me_x: (Mehrfach-)Methylierung, Rha_x: Rhamnose(-oligosaccharid), SBP: kommerzielles Zuckerrübenpektin, x: Anzahl der monomeren Einheiten

	CP1	CP2	CP3	AP1	AP2	SBP	CP1.2	CP-L1	CP-L2	AP_L
0 h										
Gal ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gal ₃	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Gal ₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gal ₅	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
GalA ₂	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
GalA ₃	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
GalA ₅ Me ₂ Ac	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GalA ₄	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
GalA ₇ Me	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4 h										
GalA	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
GalA ₂	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
GalA ₃	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
GalA ₃ MeAc	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GalA ₄	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
GalA ₇ Me	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
24 h										
GalA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GalA ₂	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rha ₂ -GalA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

9. Anhang

Gal-Rha ₂ -GalA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rha ₃ -GalA ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rha ₂ -GalA ₄ MeAc ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
48 h										
GalA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GalA ₂	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rha ₂ -GalA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Gal-Rha ₂ -GalA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rha ₃ -GalA ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rha ₃ -GalA ₄ Ac ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ara-Rha ₂ -GalA ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabelle B 18: Monosaccharidzusammensetzung (mol% \pm Standardabweichung [%], n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Mausfäzesproben. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mausversuch, in welchem Futter ohne Pektin mit einem Anteil von 20 % Cellulose eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	Man
Schwefelsäurehydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	-	-	-	-	22,4 \pm 0,1	76,0 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3
Tag 2	-	-	-	-	22,2 \pm 0,2	76,1 \pm 0,1	1,7 \pm 0,3
Tag 7	-	-	-	-	21,9 \pm 0,1	76,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1
Tag 13	-	-	-	-	28,4 \pm 0,4	69,7 \pm 0,1	1,8 \pm 0,3
Methanolyse + TFA-Hydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	3,9 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	-	55,2 \pm 0,2	32,5 \pm 0,2	5,1 \pm 0,7
Tag 2	6,8 \pm 0,5	0,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	-	51,7 \pm 0,9	33,2 \pm 1,7	3,1 \pm 0,1
Tag 7	5,2 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1	-	52,6 \pm 2,6	32,2 \pm 0,4	4,9 \pm 2,7
Tag 13	2,8 \pm 0,4	0,8 \pm 0,2	1,6 \pm 0,3	0,2 \pm 0,3	59,7 \pm 1,0	29,6 \pm 3,3	2,0 \pm 0,4

9. Anhang

Tabelle B 19: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol% \pm Standardabweichung [%], n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mäuserversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 5 % des kommerziellen Citruspektins 2 (CP2) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	Man
Schwefelsäurehydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	-	-	-	-	23,1 \pm 0,1	76,9 \pm 0,1	-
Tag 2	-	-	-	5,3 \pm 0,5	21,3 \pm 0,5	72,7 \pm 0,9	0,7 \pm 0,1
Tag 7	4,6 \pm 1,1	-	-	34,6 \pm 1,5	17,0 \pm 0,7	43,8 \pm 1,9	-
Tag 13	2,8 \pm 0,2	-	-	31,1 \pm 1,6	16,7 \pm 0,6	49,5 \pm 0,6	-
Methanolyse + TFA-Hydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	-	-	2,5 \pm 0,1	-	86,2 \pm 1,3	6,1 \pm 0,4	5,3 \pm 0,2
Tag 2	4,3 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1	2,7 \pm 0,4	-	53,3 \pm 0,6	35,4 \pm 1,2	3,7 \pm 0,6
Tag 7	4,8 \pm 0,5	-	4,8 \pm 0,3	-	55,8 \pm 0,9	31,3 \pm 1,1	3,3 \pm 0,2
Tag 13	4,0 \pm 0,6	1,1 \pm 0,6	3,4 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5	51,7 \pm 2,8	35,6 \pm 3,2	2,9 \pm 0,5

Tabelle B 20: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol% \pm Standardabweichung [%], n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mäuserversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 15 % des kommerziellen Citruspektins 2 (CP2) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	Man
Schwefelsäurehydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	-	-	-	-	22,0 \pm 0,1	76,3 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
Tag 2	-	-	-	29,7 \pm 0,6	15,6 \pm 0,1	54,7 \pm 0,8	-
Tag 7	-	-	-	24,4 \pm 0,3	16,7 \pm 0,2	58,9 \pm 0,5	-
Tag 13	0,9 \pm 0,2	-	-	15,7 \pm 0,2	17,2 \pm 0,1	63,3 \pm 1,3	2,9 \pm 0,1
Methanolyse + TFA-Hydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)			8,4 \pm 2,8		81,9 \pm 2,7		9,7 \pm 1,6
Tag 2	6,6 \pm 0,8	1,4 \pm 0,1	4,4 \pm 0,4	52,4 \pm 2,8	16,8 \pm 1,2	16,9 \pm 0,8	1,6 \pm 0,2
Tag 7	5,3 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2	4,9 \pm 0,4	50,1 \pm 1,8	18,0 \pm 0,9	19,1 \pm 1,1	1,7 \pm 0,1
Tag 13	9,6 \pm 0,4	1,7 \pm 0,1	10,5 \pm 0,6	51,5 \pm 1,3	15,5 \pm 0,8	10,7 \pm 0,5	2,3 \pm 0,2

9. Anhang

Tabelle B 21: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol% \pm Standardabweichung [%], n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mausversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 5 % des kommerziellen Apfelpektins 2 (AP2) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	Man
Schwefelsäurehydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	-	-	-	-	21,8 \pm 0,1	76,3 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2
Tag 2	-	-	-	7,0 \pm 0,4	20,6 \pm 0,4	70,8 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1
Tag 7	-	-	-	7,5 \pm 1,5	21,2 \pm 0,3	70,4 \pm 0,5	1,7 \pm 0,2
Tag 13	-	-	-	6,7 \pm 0,3	21,1 \pm 0,1	70,4 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2
Methanolyse + TFA-Hydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	3,6 \pm 0,7	0,8 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3	-	61,2 \pm 2,0	29,6 \pm 3,3	3,2 \pm 0,3
Tag 2	4,7 \pm 0,4	1,4 \pm 0,4	2,3 \pm 0,1	25,2 \pm 0,2	38,9 \pm 0,4	24,7 \pm 0,6	2,6 \pm 0,4
Tag 7	4,3 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	21,4 \pm 1,0	42,2 \pm 0,6	26,3 \pm 0,5	2,8 \pm 0,6
Tag 13	4,6 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2	2,2 \pm 0,3	25,8 \pm 0,8	38,9 \pm 0,4	25,1 \pm 0,7	2,4 \pm 0,2

Tabelle B 22: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol% \pm Standardabweichung [%], n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mäuserversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 15 % des kommerziellen Apfelppektins 2 (AP2) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	Man
Schwefelsäurehydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	-	-	-	-	22,7 \pm 0,3	76,1 \pm 0,4	1,2 \pm 0,1
Tag 2	6,8 \pm 1,2	1,1 \pm 0,2	2,1 \pm 0,4	30,4 \pm 1,6	15,7 \pm 1,1	42,7 \pm 3,2	1,1 \pm 0,3
Tag 7	4,6 \pm 1,1	0,6 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	32,9 \pm 2,1	16,7 \pm 1,1	43,7 \pm 2,3	-
Tag 13	2,9 \pm 0,3	0,5 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2	30,4 \pm 1,3	16,5 \pm 0,5	47,8 \pm 1,3	-
Methanolyse + TFA-Hydrolyse							
Tag -1 (Kontrolle)	2,7 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3	-	59,2 \pm 1,5	34,3 \pm 2,2	2,2 \pm 0,1
Tag 2	16,4 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1	4,2 \pm 0,5	51,1 \pm 2,4	15,6 \pm 0,7	9,6 \pm 1,0	1,5 \pm 0,2
Tag 7	10,0 \pm 0,7	1,4 \pm 0,1	3,3 \pm 0,3	56,9 \pm 1,2	16,0 \pm 0,3	10,9 \pm 0,3	1,6 \pm 0,5
Tag 13	12,7 \pm 0,8	1,9 \pm 0,1	6,4 \pm 0,5	36,5 \pm 8,7	24,4 \pm 4,0	15,4 \pm 3,7	2,7 \pm 0,2

9. Anhang

Tabelle B 23: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol% \pm Standardabweichung [%], n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mausversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 15 % des labortechnisch extrahierten Citruspektins 1 (CP-L1) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-) Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	Man
Schwefelsäurehydrolyse							
Tag -7 (Kontrolle)	-	-	2,0 \pm 0,7	-	26,7 \pm 0,8	68,7 \pm 0,3	2,7 \pm 0,4
Tag 25	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	81,0 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	11,0 \pm 0,5	0,7 \pm 0,1
Tag 28	1,4 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	4,5 \pm 0,6	44,8 \pm 4,0	12,8 \pm 0,1	32,6 \pm 2,8	1,7 \pm 0,4
Methanolyse + TFA-Hydrolyse							
Tag -7 (Kontrolle)	6,3 \pm 2,8	-	12,0 \pm 2,5	-	49,9 \pm 3,7	27,3 \pm 4,6	4,6 \pm 0,4
Tag 25	7,2 \pm 1,2	3,0 \pm 0,4	8,0 \pm 1,0	55,0 \pm 1,0	13,2 \pm 1,2	13,2 \pm 1,0	-
Tag 28	4,5 \pm 0,5	3,0 \pm 0,1	6,5 \pm 0,2	54,9 \pm 3,3	12,4 \pm 0,8	12,4 \pm 0,8	-

Tabelle B 24: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol% \pm Standardabweichung [%], n=3) der ethanolunlöslichen Polysaccharide der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mausversuch, in welchem Futter ohne Pektine (Kontrolle) sowie Futter mit einem Anteil von 15 % des labortechnisch extrahierten Apfelpektins 1 (AP-L) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	Man
Schwefelsäurehydrolyse							
Tag -7 (Kontrolle)	-	-	1,1 \pm 0,2	-	26,2 \pm 1,5	69,9 \pm 2,5	2,8 \pm 0,1
Tag 25	1,6 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	5,4 \pm 0,6	32,5 \pm 2,9	32,0 \pm 2,4	24,2 \pm 2,2	2,2 \pm 0,8
Tag 28	1,5 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	4,2 \pm 0,2	41,7 \pm 0,1	18,7 \pm 0,1	29,2 \pm 0,3	2,3 \pm 0,1
Methanolyse + TFA-Hydrolyse							
Tag -7 (Kontrolle)	3,2 \pm 1,4	-	6,6 \pm 0,6	-	38,6 \pm 4,7	45,8 \pm 3,4	5,8 \pm 0,6
Tag 25	3,0 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	10,6 \pm 0,7	68,3 \pm 3,2	5,1 \pm 1,5	9,3 \pm 0,3	1,5 \pm 0,8
Tag 28	3,2 \pm 0,3	2,5 \pm 0,1	8,2 \pm 0,5	64,3 \pm 2,8	6,5 \pm 0,3	13,1 \pm 1,2	2,1 \pm 0,2

Tabelle B 25: Monosaccharidzusammensetzungen (in mol%, n=1) der präparativ isolierten Mono-, Di- und Oligosaccharide aus den ethanollöslichen Fraktionen der Fäzesproben der Mäuse. Die Proben entstammen einem *in vivo* Mausversuch, in welchem Futter mit einem Anteil von 15 % des kommerziellen Apfelpektins 2 (AP2) eingesetzt wurde. Die Isolierung der Verbindungen erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulst amperometrischer Detektion (PAD) gekoppelt mit einem Fraktionssammler. Die Hydrolyse der Di- und Oligosaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse, die Analyse der Monosaccharide mittels HPAEC-PAD. Cello: Cellobiose, Gal: Galactose, GalA_x: Galacturonsäure(-oligosaccharide), Glc: Glucose, Rha: Rhamnose, RT: Retentionszeit

Verbindung	RT [min]	Gal	Rha	GalA	Glc
Cello	12,8	-	-	-	100
GalA	38,2	-	-	100	-
GalA ₂	66,3	2,4	3,8	83,5	10,3
GalA ₃	76,4	-	-	79,7	20,3

9. Anhang

Tabelle B 26: Monosaccharidzusammensetzung der ethanolunlöslichen Polysaccharide der humanen Fäzesproben (mol% ± Standardabweichung [%], n=3). Die Proben entstammen der Placebogruppe einer humanen *in vivo* Fermentation, in welcher täglich 10 g Maltodextrin als Placebo-Nahrung verabreicht wurde. Die Proben wurden *in vivo* am Beginn der Studie (Tag 0) und nach Ende der Studie (Tag 60) genommen. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide nach Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, GlcA: Glucuronsäure, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	GlcA	Man
Schwefelsäurehydrolyse								
Proband 1 – Tag 0	16,8 ± 0,5	6,4 ± 0,1	43,3 ± 1,0	-	-	33,5 ± 1,4	-	-
Proband 1 – Tag 60	28,0 ± 0,3	-	30,9 ± 0,1	-	-	41,1 ± 0,3	-	-
Proband 2 – Tag 0	26,2 ± 0,3	-	27,3 ± 0,9	-	-	46,5 ± 1,2	-	-
Proband 2 – Tag 60	30,3 ± 0,1	-	41,6 ± 0,8	-	-	28,0 ± 0,9	-	-
Proband 3 – Tag 0	24,4 ± 1,2	-	42,1 ± 0,7	-	-	33,8 ± 0,5	-	-
Proband 3 – Tag 60	27,0 ± 0,4	-	42,1 ± 0,1	-	-	30,9 ± 0,3	-	-
Proband 4 – Tag 0	21,4 ± 0,9	-	37,9 ± 0,5	-	-	40,8 ± 0,4	-	-
Proband 4 – Tag 60	31,5 ± 0,3	-	38,8 ± 0,2	-	-	29,7 ± 0,6	-	-
Proband 5 – Tag 0	25,2 ± 6,9	-	24,7 ± 4,3	-	-	50,1 ± 11,2	-	-
Proband 5 – Tag 60	24,0 ± 6,8	-	26,7 ± 4,5	-	-	49,3 ± 11,2	-	-
Methanolyse + TFA-Hydrolyse								
Proband 1 – Tag 0	25,9 ± 0,8	-	38,1 ± 0,8	-	-	36,0 ± 0,8	-	-
Proband 1 – Tag 60	34,5 ± 1,4	-	26,5 ± 1,4	-	-	39,0 ± 0,1	-	-
Proband 2 – Tag 0	32,3 ± 0,5	5,2 ± 1,6	15,6 ± 0,1	-	-	46,9 ± 1,1	-	-
Proband 2 – Tag 60	39,8 ± 0,1	6,9 ± 0,1	23,3 ± 0,2	-	-	30,1 ± 0,5	-	-
Proband 3 – Tag 0	26,2 ± 4,1	-	25,0 ± 2,5	-	-	48,8 ± 6,5	-	-

Proband 3 – Tag 60	37,7 ± 1,8	-	27,0 ± 0,7	-	-	35,2 ± 2,4	-	-
Proband 4 – Tag 0	28,3 ± 1,2	2,6 ± 4,4	26,7 ± 2,0	-	-	42,4 ± 2,9	-	-
Proband 4 – Tag 60	40,3 ± 3,0	4,0 ± 6,9	23,3 ± 1,6	-	-	32,4 ± 2,5	-	-
Proband 5 – Tag 0	23,1 ± 0,2	-	12,8 ± 0,5	-	-	56,2 ± 0,5	-	-
Proband 5 – Tag 60	34,2 ± 0,9	-	18,5 ± 0,5	-	-	40,3 ± 0,8	-	-

Tabelle B 27: Monosaccharidzusammensetzung der ethanolunlöslichen Polysaccharide der humanen Fäzesproben (mol% ± Standardabweichung [%], n=3). Die Proben entstammen der aktiven Gruppe einer humanen *in vivo* Fermentation, in welcher täglich 20 g des kommerziellen Apfelpektins (AP2) als „aktive“ Nahrung verabreicht wurde. Die Proben wurden vor Beginn der Studie (Tag 0) und nach Ende der Studie (Tag 60) genommen. Die Hydrolyse der Polysaccharide erfolgte mittels Methanolyse und Trifluoressigsäure-(TFA-)Hydrolyse sowie Schwefelsäurehydrolyse, die Analyse der Monosaccharide nach Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD). Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, GlcA: Glucuronsäure, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

	Gal	Ara	Rha	GalA	Xyl	Glc	GlcA	Man
Schwefelsäurehydrolyse								
Proband 6 – Tag 0	26,3 ± 0,4	6,7 ± 0,2	41,4 ± 0,1	-	-	25,7 ± 0,1	-	-
Proband 6 – Tag 60	24,5 ± 0,2	-	49,3 ± 0,2	-	-	26,2 ± 0,1	-	-
Proband 7 – Tag 0	21,5 ± 0,1	6,3 ± 0,7	35,1 ± 1,7	-	-	27,7 ± 0,5	-	9,4 ± 0,5
Proband 7 – Tag 60	18,9 ± 1,4	-	24,0 ± 1,8	30,0 ± 1,3	-	27,1 ± 0,9	-	-
Proband 8 – Tag 0	25,4 ± 0,1	6,9 ± 0,1	30,9 ± 0,3	-	-	31,5 ± 0,2	-	5,3 ± 0,1
Proband 8 – Tag 60	28,5 ± 0,4	-	38,3 ± 0,2	-	-	33,2 ± 0,6	-	-
Proband 9 – Tag 0	29,7 ± 0,2	-	37,4 ± 0,1	-	-	32,8 ± 0,4	-	-
Proband 9 – Tag 60	32,0 ± 0,1	-	34,8 ± 0,2	-	-	33,3 ± 0,3	-	-
Proband 10 – Tag 0	25,8 ± 0,1	-	25,3 ± 1,6	-	-	39,9 ± 1,6	-	9,1 ± 0,1
Proband 10 – Tag 60	28,5 ± 0,1	-	31,7 ± 0,3	9,2 ± 0,2	-	30,6 ± 0,1	-	-

9. Anhang

Proband 11 – Tag 0	28,4 ± 2,5	-	41,7 ± 1,0	-	-	29,9 ± 1,5	-	-
Proband 11 – Tag 60	25,1 ± 3,8	4,7 ± 0,7	37,5 ± 0,8	8,6 ± 0,9	-	15,4 ± 1,3	3,0 ± 0,2	5,6 ± 0,2
Proband 12 – Tag 0	27,6 ± 1,7	-	40,3 ± 0,1	-	-	32,1 ± 1,8	-	-
Proband 12 – Tag 60	30,1 ± 1,1	-	38,3 ± 0,5	-	-	31,6 ± 1,6	-	-
Proband 13 – Tag 0	23,5 ± 0,4	-	40,7 ± 0,2	-	-	35,8 ± 0,6	-	-
Proband 13 – Tag 60	19,4 ± 0,1	-	53,1 ± 0,3	-	-	27,4 ± 0,4	-	-
Proband 14 – Tag 0	30,8 ± 0,1	-	34,3 ± 1,3	-	-	34,9 ± 1,4	-	-
Proband 14 – Tag 60	24,5 ± 0,2	8,8 ± 0,7	24,5 ± 0,2	-	14,3 ± 0,6	26,4 ± 0,4	-	-
Methanolyse + TFA- Hydrolyse								
Proband 6 – Tag 0	30,6 ± 1,2	-	32,7 ± 1,1	-	-	36,8 ± 0,8	-	-
Proband 6 – Tag 60	39,2 ± 1,0	-	38,6 ± 1,2	-	-	22,2 ± 0,8	-	-
Proband 7 – Tag 0	33,5 ± 0,6	-	29,1 ± 0,8	-	-	37,4 ± 0,3	-	-
Proband 7 – Tag 60	26,9 ± 1,0	-	18,4 ± 1,1	23,7 ± 0,6	-	31,0 ± 1,1	-	-
Proband 8 – Tag 0	34,8 ± 0,5	-	20,0 ± 0,6	-	-	37,2 ± 0,9	-	8,0 ± 0,2
Proband 8 – Tag 60	41,1 ± 0,9	-	24,9 ± 0,6	-	-	34,0 ± 0,2	-	-
Proband 9 – Tag 0	36,8 ± 0,1	-	25,6 ± 0,1	-	-	37,6 ± 0,1	-	-
Proband 9 – Tag 60	42,4 ± 0,2	-	34,2 ± 0,3	-	-	23,3 ± 0,2	-	-
Proband 10 – Tag 0	37,9 ± 0,2	-	24,8 ± 0,6	-	-	37,3 ± 0,4	-	-
Proband 10 – Tag 60	36,1 ± 0,1	7,8 ± 0,3	19,7 ± 0,3	6,5 ± 0,4	-	29,9 ± 0,3	-	-
Proband 11 – Tag 0	36,7 ± 0,2	-	17,0 ± 0,3	-	-	34,3 ± 0,4	-	12,0 ± 0,5
Proband 11 – Tag 60	34,9 ± 0,6	-	17,2 ± 0,4	9,2 ± 0,7	-	30,2 ± 0,3	-	8,5 ± 0,8

Proband 12 – Tag 0	35,7 ± 1,0	-	27,5 ± 0,8	-	-	36,8 ± 0,5	-	-
Proband 12 – Tag 60	38,0 ± 0,5	-	27,8 ± 0,8	-	-	34,1 ± 0,5	-	-
Proband 13 – Tag 0	32,6 ± 0,2	-	24,1 ± 0,4	-	-	34,9 ± 0,6	-	8,4 ± 0,2
Proband 13 – Tag 60	28,4 ± 0,3	-	34,0 ± 1,2	-	-	30,2 ± 0,7	-	7,4 ± 0,8
Proband 14 – Tag 0	30,3 ± 1,0	6,4 ± 0,3	21,3 ± 0,5	-	7,6 ± 0,3	24,2 ± 0,5	-	10,2 ± 0,4
Proband 14 – Tag 60	30,6 ± 2,0	6,8 ± 1,0	17,1 ± 1,3	2,0 ± 0,1	12,8 ± 2,1	24,2 ± 2,0	-	6,5 ± 2,4

10. PUBLIKATIONSLISTE

PUBLIKATIONEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

Steigerwald, H., Blanco-Perez, F., Albrecht, M., **Bender, C.**, Wangorsch, A., Endreß, H.-U., Bunzel, M., Mayorga, C., Torres, M. J., Scheurer, S., Vieths, S. (2021). Does the food ingredient pectin provide a risk for patients allergic to non-specific lipid-transfer proteins? *Foods*. 11 (1): 13.

Bender, C., Stoll, D., Huch, M., Weinert, C., Dötsch, A., Dräger, H., Keller, J., Bunzel, M. (2023). Time-dependent fermentation of different structural units of commercial pectins with intestinal bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 120642.

PRÄSENTATIONEN AUF FACHTAGUNGEN

Bender, C. (2022). Time-dependent fermentation of different structural elements of pectins by human intestinal bacteria. *8th International Conference on Dietary Fibre*, Leuven.

Bender, C. (2023). Zeitabhängige Veränderungen der Feinstruktur strukturell unterschiedlicher Pektine in *in vitro* Fermentationsstudien mit humanen Intestinalbakterien. *Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Karlsruhe.

POSTERBEITRÄGE AUF FACHTAGUNGEN

Bender, C. (2022). Zeitliche Abhängigkeit der Fermentation verschiedener Struktureinheiten von Pektinen durch humane Darmbakterien. *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Hamburg.