

Charakterisierung funktioneller Zusammenhänge zwischen Extraktionsbedingungen, molekularer Struktur und Emulgierereigenschaften von Zuckerrübenpektinen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Hendrik Paul Eichhöfer

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

2. Referent: Prof. Dr. Daniel Wefers

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2023

*DAS LEBEN ZWINGT UNS, STETS ZU ÜBERDENKEN;
WAS IST ERSTREBENSWERT, WAS LÄSST MAN LIEBER WEG.
ZEIT IST BEGRENZT – MAN KANN SIE NICHT VERSCHENKEN –
NUR SINNVOLL NUTZEN, DAS IST LEBENSZWECK.*

HANS-JÜRGEN EICHHÖFER

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 10.08.2023

Hendrik Paul Eichhöfer

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Pflanzliche Zellwände	2
1.2	Struktureller Aufbau von Zellwandpolysacchariden.....	3
1.2.1	Cellulose.....	4
1.2.2	Xyloglucane.....	4
1.2.3	Xylane	4
1.2.4	Mannane.....	5
1.3	Struktureller Aufbau von Pektinen	5
1.3.1	Homogalacturonane.....	5
1.3.2	Substituierte Galacturonane.....	6
1.3.3	Rhamnogalacturonan Typ I	7
1.3.4	Makromolekulare Pektinstruktur.....	8
1.4	Ernährungsphysiologische Eigenschaften von Pektinen	10
1.5	Pektine als funktionelle Lebensmittelzusatzstoffe	12
1.5.1	Pektine als Gelbildner	12
1.5.2	Pektine als Emulgatoren	13
1.5.2.1	Emulsionen	13
1.5.2.2	Zusammenhänge zwischen Pektinstruktur und Emulgiereigenschaften.....	15
2	Zielsetzung	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Pektinextraktion	21
3.1.1	Verwendete Rohstoffe.....	21
3.1.2	Extraktionsmethoden.....	21
3.2	Strukturcharakterisierung der extrahierten Pektine	23
3.2.1	Molekulargewichtsbestimmung.....	23
3.2.2	Charakterisierung der Proteinfraktion.....	28
3.2.2.1	Bestimmung des Proteingehalts.....	29
3.2.2.2	Aminosäurezusammensetzung.....	30
3.2.3	Charakterisierung der Polysaccharidfraktion	31
3.2.3.1	Monosaccharidzusammensetzung.....	31
3.2.3.2	Analyse der glykosidischen Bindungen.....	32
3.2.3.3	Enzymatisches Arabinanprofiling.....	34
3.2.4	Analyse hydrophober Substituenten.....	35
3.2.4.1	Bestimmung des <i>trans</i> -Ferulasäuregehalts.....	35
3.2.4.2	Bestimmung des Methylierungs- und Acetylierungsgrads.....	36
3.3	Gezielte Modifikation der Pektinstruktur	39

3.3.1	Modifikation des Veresterungsgrads durch Alkalibehandlung.....	40
3.3.2	Enzymatische Modifikation verschiedener Strukturelemente	42
3.3.3	Enzymatische Modifikation der Arabinanfraktion	43
3.3.4	Enzymatische Modifikation der Galacturonanfraktion.....	44
3.4	Charakterisierung der Emulgierereigenschaften	45
4	Ergebnisse und Diskussion.....	47
4.1	Entwicklung von Methoden zur Pektinextraktion aus Zuckerrübenschnitzeln.....	47
4.1.1	Säureextraktionen.....	47
4.1.2	Enzymatisch unterstützte Extraktionen	54
4.1.3	Autoklavenextraktionen	56
4.2	Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen	57
4.2.1	Abhängigkeit der Pektinausbeute von den Extraktionsbedingungen	58
4.2.2	Abhängigkeit der Pektinstruktur von den Extraktionsbedingungen	60
4.2.2.1	Molekulargewicht.....	60
4.2.2.2	Monosaccharidzusammensetzung	62
4.2.2.3	Glykosidische Bindungsverhältnisse	66
4.2.2.4	Proteingehalt.....	69
4.2.2.5	Aminosäurezusammensetzung der Proteinfraction	71
4.2.2.6	Phenolische Säuren.....	72
4.2.2.7	Methylierungsgrad.....	74
4.2.2.8	Acetylierungsgrad	76
4.2.3	Abhängigkeit der Emulgierereigenschaften von den Extraktionsbedingungen	77
4.3	Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgierereigenschaften	79
4.3.1	Struktur-Eigenschaftskorrelationen säureextrahierter Pektine.....	79
4.3.1.1	Proteingehalt vs. $X_{90,3}$	80
4.3.1.2	Methylierungsgrad vs. $X_{90,3}$	81
4.3.1.3	Acetylierungsgrad vs. $X_{90,3}$	82
4.3.1.4	Galacturonsäureanteil vs. $X_{90,3}$	83
4.3.1.5	Anteil neutraler Seitenketten vs. $X_{90,3}$	84
4.3.1.6	Anteil an Galactanseitenketten vs. $X_{90,3}$	85
4.3.1.7	Anteil an Arabinanseitenketten vs. $X_{90,3}$	86
4.3.1.8	Mittleres Molekulargewicht vs. $X_{90,3}$	87
4.3.1.9	<i>trans</i> -Ferulasäuregehalt vs. $X_{90,3}$	88
4.3.2	Struktur-Eigenschaftszusammenhänge autoklavenextrahierter Pektine	89
4.3.3	Gezielte Modifikation der Pektinstruktur.....	91
4.3.3.1	Modifikation des Veresterungsgrads durch chemische Entesterung.....	91
4.3.3.2	Enzymatische Modifikation verschiedener Strukturelemente.....	94
4.3.3.3	Enzymatische Modifikation der Arabinanfraktion.....	97
4.3.3.4	Enzymatische Modifikation der Galacturonanfraktion	104

4.4	Untersuchung weiterer pflanzlicher Ausgangsmaterialien	107
4.5	Untersuchung von Weintraubenpektinen.....	110
4.6	Zusammenfassende Diskussion	115
5	Zusammenfassung	127
6	Literaturverzeichnis	131
7	Chemikalien und Instrumente	149
7.1	Chemikalien	149
7.2	Enzympräparate.....	152
7.3	Puffer und Lösungen	153
7.4	Instrumente.....	154
7.4.1	Chromatographische Säulen.....	154
7.4.2	Analysengeräte	155
8	Arbeitsvorschriften	157
8.1	Pektinextraktion	157
8.1.1	Säureextraktion.....	157
8.1.2	Enzymatisch unterstützte Extraktion.....	158
8.1.3	Autoklavenextraktion.....	158
8.2	Strukturcharakterisierung der extrahierten Pektine	159
8.2.1	Molekulargewichtsbestimmung.....	159
8.2.2	Charakterisierung der Proteinfraktion.....	159
8.2.2.1	Bestimmung des Proteingehalts.....	159
8.2.2.2	Aminosäurezusammensetzung.....	160
8.2.3	Charakterisierung der Polysaccharidfraktion	161
8.2.3.1	Monosaccharidzusammensetzung	161
8.2.3.2	Analyse der glykosidischen Bindungen mittels Methylierungsanalyse.....	162
8.2.3.3	Enzymatisches Arabinanprofiling	163
8.2.4	Analyse hydrophober Substituenten.....	164
8.2.4.1	Bestimmung des Ferulasäuregehalts	164
8.2.4.2	Bestimmung des Acetylierungs- und Methylierungsgrads.....	165
8.3	Gezielte Modifikation der Pektinstruktur	166
8.3.1	Modifikation des Veresterungsgrads durch Alkalibehandlung.....	166
8.3.2	Enzymatische Modifikation verschiedener Strukturelemente	166
8.3.3	Enzymatische Modifikation der Arabinanfraktion	167
8.3.4	Enzymatische Modifikation der Galacturonanfraktion.....	167
8.4	Enzymatischer Stärkeabbau des Traubenpektins.....	168
9	Anhang.....	169
9.1	Tabellen	169
9.2	Abbildungen.....	178

10	Publikationsliste.....	181
----	------------------------	-----

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(o/w)-Emulsion	Öl-in-Wasser-Emulsion
A ₂	zweiter Virialkoeffizient
AA	<i>endo</i> - α -1,5-L-Arabinanase
AF	α -L-Arabinofuranosidase
AG-I	Arabinogalactan Typ I
AG-II	Arabinogalactan Typ II
AGP	Arabinogalactanprotein
AMG	Amyloglucosidase
AQC	6-Aminoquinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidylcarbammat
Ara	Arabinose
AT	Apfeltrester
BSA	bovines Serumalbumin
CCRC	<i>Complex Carbohydrate Research Center</i>
CT	Citrustrester
D	Polydispersitätsindex
DAc	Acetylierungsgrad (<i>degree of acetylation</i>)
DAD	Diodenarray Detektion (<i>diode array detection</i>)
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DM	Methylierungsgrad (<i>degree of methylation</i>)
<i>dn/dc</i>	Brechungsindexinkrement
DP	Polymerisationsgrad (<i>degree of polymerization</i>)
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FFF	Feld-Fluss-Fraktionierung
FID	Flammenionisationsdetektion
FLD	Fluoreszenzdetektion
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure (<i>galacturonic acid</i>)
GC	Gaschromatographie
HG	Homogalacturonan
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (<i>high performance anion exchange chromatography</i>)

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRGP	hydroxyprolinreiche Glykoproteine
IPA	Isopropanol
I_{θ}	Streulichtintensität bei Winkel θ
KP	Kartoffelpülpe
KT	Karottentrester
MALS	Mehrwinkellichtstredetektion
M_N	mittleres Molekulargewicht (Zahlenmittel)
MS	Massenspektrometrie
M_w	mittleres Molekulargewicht (Gewichtsmittel)
M_z	mittleres Molekulargewicht (Zentrifugenmittel)
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PAD	gepulste amperometrische Detektion (<i>pulsed amperometric detection</i>)
PGA	<i>endo</i> - α -1,4-D-Polygalacturonase
PLY	Pektinlyase
PMAA	permethylierte Alditolacetate
P_{θ}	Partikelstreuungsfunktion
R_G	Gyrationsradius
RG-I	Rhamnogalacturonan Typ I
RG-II	Rhamnogalacturonan Typ II
RI	Brechungsindex (<i>refractive index</i>)
RP	Umkehrphasen
R_{θ}	Rayleigh-Verhältnis
S/L	Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis (<i>solid-to-liquid ratio</i>)
SB	Zuckerrübenschnitzel (<i>sugar beet pulp</i>)
SBP	Zuckerrübenpektin (<i>sugar beet pectin</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SPME	Festphasenmikroextraktion (<i>solid phase microextraction</i>)
TFA	Trifluoressigsäure
<i>t</i> -FA	<i>trans</i> -Ferulasäure
TMSP- d_4	3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3- d_4 -säure
VO (EG)/(EU)	Verordnung der Europäischen Gemeinschaft / der Europäischen Union
WT	Weintraubentrester
$x_{90,3}$	90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung einer Emulsion

1 EINLEITUNG

Amphiphile Moleküle weisen sowohl hydrophile als auch lipophile Abschnitte auf und spielen eine wichtige Rolle in vielen Bereichen des menschlichen Lebens, sei es in Form von Phospholipiden und Glykolipiden als essentielle Bestandteile von Zellmembranen oder in Form von Gallensäuren bei der Verdauung und duodenalen Resorption. Aufgrund ihrer phasenverbindenden Eigenschaften wirken amphiphile Moleküle zudem als Emulgatoren. Verschiedene Vertreter werden daher in der pharmazeutischen, kosmetischen und lebensmittelverarbeitenden Industrie zur Herstellung von Emulsionen eingesetzt.

Viele der bisher in Lebensmitteln eingesetzten Emulgatoren sind synthetischer Natur (z.B. Polysorbate), tierischen Ursprungs (z.B. Molkenproteine) oder werden aus Pflanzen gewonnen, die unter den hiesigen klimatischen Bedingungen nicht kultiviert werden können und daher über weite Transportwege importiert werden müssen (z.B. Gummi arabicum). Angesichts einer steigenden Nachfrage nach pflanzlichen, regionalen und nachhaltigen Produkten sind Alternativen zu den etablierten Emulgatoren gefragt. Pektine könnten diesen Anforderungen gerecht werden, da sie als essentieller Bestandteil pflanzlicher Zellwände aus einer Vielzahl an pflanzlichen Rohstoffen bzw. Industrienebenprodukten gewonnen werden können und in Abhängigkeit vom Rohstoff eine entsprechende Funktionalität aufweisen. Die Nutzung regionaler Industrienebenströme hat aus ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten verschiedene Vorteile; einerseits werden kurze Transportwege ermöglicht, andererseits werden ohnehin anfallende Materialien verwendet, sodass keine zusätzlichen landwirtschaftlichen Flächen für den Anbau entsprechender Pflanzen verwendet werden müssen.

Trotz der Vielzahl an möglichen Ausgangsmaterialien erfolgt die kommerzielle Pektinextraktion bisweilen fast ausschließlich aus Apfel- und Citrustrester. Diese Pektine werden in Lebensmitteln allerdings nicht als Emulgatoren, sondern aufgrund ihrer Verdickungs- und Gelbildungseigenschaften eingesetzt. Ein Grund hierfür ist, dass ihre emulsionsstabilisierenden Eigenschaften weit hinter denen etablierter Emulgatoren zurückbleiben. Jedoch können die funktionellen Eigenschaften von Pektinen in Abhängigkeit von ihrem botanischen Ursprung stark variieren. So ist bereits bekannt, dass Zuckerrübenpektine (*sugar beet pectins*, SBP) durch gute Emulgiereigenschaften gekennzeichnet sind, die denen von Gummi arabicum zum Teil überlegen sind (Nakauma *et al.* 2008; Niu *et al.* 2022). SBP können aus Zuckerrübenschnitzeln extrahiert werden, die als Nebenprodukt der industriellen Zuckergewinnung anfallen und bislang größtenteils als Futtermittel Verwendung finden. Die Anbaumenge von Zuckerrüben ist in Deutschland im Jahr 2021 mit etwa 32 Mt bedeutend höher als beispielsweise von Weizen (ca. 22 Mt), Kartoffeln (ca. 11 Mt), Mais (ca. 4 Mt) oder Äpfeln (ca. 1 Mt), sodass regional große Mengen an Zuckerrübenschnitzeln anfallen (FAO 2021). Zusammen mit den guten Emulgiereigenschaften von SBP ergibt sich ein entsprechend hohes Potential von Zuckerrübenschnitzeln als Rohstoff zur Pektinextraktion.

1 Einleitung

Die Anwendung von SBP als Emulgator in Lebensmitteln wird allerdings dadurch limitiert, dass die Zusammenhänge zwischen der komplexen Pektinstruktur und den Emulgiereigenschaften nur unzureichend aufgeklärt sind. Zudem wurden Extraktionsverfahren noch nicht systematisch hinsichtlich der Verbesserung der Emulgiereigenschaften der extrahierten Pektine optimiert. Die Kenntnis über den Einfluss der Pektinextraktion auf die resultierende Struktur und die damit einhergehenden funktionellen Eigenschaften ist allerdings unerlässlich, um eine gezielte Extraktion von SBP mit hervorragenden emulsionsstabilisierenden Eigenschaften zu ermöglichen.

1.1 PFLANZLICHE ZELLWÄNDE

Pflanzliche Zellwände sind die primäre Ballaststoffquelle in der Humanernährung und haben dementsprechend eine ausgesprochen hohe ernährungsphysiologische Relevanz. Aus pflanzenphysiologischer Sicht ist die Ausbildung einer stabilen Struktur um die Membran des Protoplasten unerlässlich. Die pflanzliche Zellwand sorgt jedoch nicht nur für die mechanische Stabilität, sondern schützt die Zelle auch vor unterschiedlich gearteten biotischen und abiotischen Einflüssen. Darüber hinaus erfüllt die Zellwand essentielle Funktionen in Bezug auf den Wasser- und Stofftransport, die intrazelluläre Kommunikation und die Regulation des Zellwachstums (Carpita und Gibeaut 1993; McDougall *et al.* 1996). Der Vielzahl an Funktionen entsprechend sind pflanzliche Zellwände komplexe Systeme aus unterschiedlichen, miteinander interagierenden Molekülen wie Polysacchariden, Proteinen und Polyphenolen. Auch wenn die strukturelle Zusammensetzung je nach Pflanzengattung, Zelltyp und Entwicklungsstadium variieren kann, lassen sich pflanzliche Zellwände prinzipiell in die drei Untereinheiten Mittellamelle, Primärzellwand und Sekundärzellwand einteilen (McDougall *et al.* 1996). Jede dieser Zellwandkomponenten weist spezifische Funktionen und dementsprechend auch unterschiedliche strukturelle Zusammensetzungen auf (McDougall *et al.* 1996; Caffall und Mohnen 2009).

Die in den Zellzwischenräumen lokalisierte und überwiegend aus Pektinen zusammengesetzte Mittellamelle ist unter anderem entscheidend an der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt (Daher und Braybrook 2015). Auf die Mittellamelle ist die Primärzellwand aufgelagert, die aus einem komplexen Netzwerk aus Cellulosemikrofibrillen, Hemicellulosen, Pektinen und Proteinen aufgebaut ist. Die strukturelle Zusammensetzung der Primärzellwand kann beträchtlich variieren. Nichtsdestotrotz können die Primärzellwände von Landpflanzen grob in zwei Typen eingeteilt werden. Typ I Primärzellwände sind neben Cellulose durch hohe Anteile an Pektinen und Xyloglucanen gekennzeichnet, während Typ II Primärzellwände überwiegend aus Cellulose und (Arabino-) Xylanen aufgebaut sind. Die Primärzellwände commelinider, monokotyler Pflanzen weisen üblicherweise Strukturcharakteristika des letztgenannten Primärzellwand Typs auf. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Rohstoffen handelt es sich jedoch ausnahmslos um dikotylen Pflanzenmaterial. Die Primärzellwände von dikotylen Pflanzen sind, ebenso wie bei nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen, den Typ I Primärzellwänden

1.2 Struktureller Aufbau von Zellwandpolysacchariden

zuzuordnen (Harris und Smith 2006; Vogel 2008). Dementsprechend liegt der Fokus der folgenden Abschnitte auf der Beschreibung der Zellwandstruktur der Typ I Primärzellwände.

Im Zuge des Zellwachstums unterliegen die Primärzellwandpolysaccharide vielfältigen Aufbau-, Abbau- und Modifikationsreaktionen, um so unter anderem die Ausdehnung der Zelle zu ermöglichen (Carpita und Gibeaut 1993). Mit Abschluss des Wachstums wird die Zellwand in Abhängigkeit vom Gewebetyp durch Auflagerung der Sekundär- auf die Primärzellwand verfestigt. Die üblicherweise erheblich breitere Sekundärzellwand ist bei dikotylen Pflanzen überwiegend aus Cellulose, Xylanen und Lignin zusammengesetzt (Zhong und Ye 2015). Zudem wird diskutiert, ob auch Pektine in geringem Ausmaß in die Sekundärzellwandstruktur involviert sind (Mohnen 2008).

Für die Zellwandstruktur sind auch verschiedene Nicht-Polysaccharidkomponenten von großer Bedeutung. Proteine wie Extensine, AGP und andere prolin- und glycinreiche Proteine erfüllen unter anderem wichtige strukturgebende Funktionen in der pflanzlichen Zellwand (Showalter 1993; Sommer-Knudsen *et al.* 1998). Das Verhältnis von Primär- zu Sekundärzellwänden variiert insbesondere in Abhängigkeit vom vorliegenden Gewebetyp. Bei parenchymatischen Zellen, die die quantitativ dominante Gewebeart von in der Humanernährung eingesetzten pflanzlichen Lebensmitteln darstellt, ist der Anteil an Sekundärzellwänden vergleichsweise gering (McDougall *et al.* 1996).

1.2 STRUKTURELLER AUFBAU VON ZELLWANDPOLYSACCHARIDEN

Die in pflanzlichen Zellwänden vorzufindenden Polysaccharide sind größtenteils aus den in Abbildung 1 dargestellten Monosacchariden aufgebaut und können über verschiedene Ringpositionen glykosidisch miteinander verknüpft sein. Auch wenn vereinzelt abweichende Strukturen vorzufinden sind, liegen die Monosaccharide innerhalb eines Polysaccharids größtenteils in einer Enantiomerenform (D/L), einer Konfiguration (α/β) und einer Ringform (Pyranose/Furanose) vor. Nachfolgend werden verschiedene Zellwandpolysaccharide vorgestellt. Aufgrund des Fokus auf Pektine werden diese ausführlich in Abschnitt 1.3 behandelt.

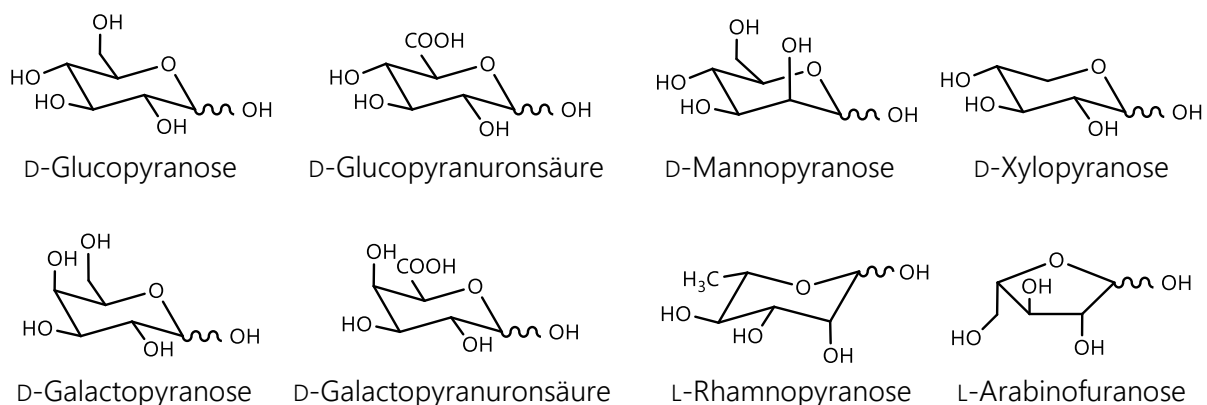


Abbildung 1: Strukturen von Monosaccharideinheiten, die in Bezug auf die Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand von hoher Relevanz sind

1 Einleitung

1.2.1 CELLULOSE

Cellulose ist das quantitativ bedeutendste organische Polymer der Welt. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass Cellulose einen elementaren Bestandteil pflanzlicher Zellwände darstellt und dementsprechend ubiquitär vorzufinden ist (Klemm *et al.* 2005). Cellulosemoleküle sind lineare Ketten aus β -1,4-verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten, die alternierend um 180° gedreht sind. Dementsprechend kann Cellobiose als repetitives Grundelement angesehen werden. Aufgrund der hochlinearen Struktur können sich die bis zu 15000 Einheiten langen Celluloseketten über die Ausbildung einer Vielzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zu stabilen Mikrofibrillen zusammenlagern (McDougall *et al.* 1996). Die wasserunlöslichen Mikrofibrillen bilden das Grundgerüst aller pflanzlichen Zellwände. Während Cellulose in Sekundärzellwänden vor allem in hoch-geordneter („kristalliner“) Form vorzufinden ist, liegt sie in Primärzellwänden in höheren Anteilen in eher ungeordneter („amorpher“) Form vor (O'Sullivan 1997). Hierdurch ist die enzymatische Zugänglichkeit in den Primärzellwänden gewährleistet, die für die Modifikation im Zuge des Zellwachstums benötigt wird (Carpita und Gibeaut 1993; Klemm *et al.* 2005).

1.2.2 XYLOGLUCANE

In den meisten dikotylen Pflanzen stellen Xyloglucane die quantitativ bedeutendste Hemicellulosefraktion dar (McNeil *et al.* 1984). Das Rückgrat von Xyloglucanen ist, wie bei Cellulose, aus β -1,4-verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten zusammengesetzt. Bei Xyloglucanen sind die Glucoseeinheiten jedoch teilweise über Position O6 mit α -D-Xylopyranosylresten substituiert. Der Substitutionsgrad liegt bei dikotylen Pflanzen üblicherweise im Bereich von 50 - 75 % (Fry 1989). Die Xyloseeinheiten können wiederum mit verschiedenen kurzen Seitenketten aus Galactose, Fucose, Arabinose oder Xylose substituiert sein (Tuomivaara *et al.* 2015). Das Substitutionsmuster hat Auswirkungen auf die Eigenschaften der Xyloglucane wie die Löslichkeit und ist in der Regel charakteristisch für bestimmte Pflanzenfamilien (Scheller und Ulvskov 2010; Schultink *et al.* 2014; Steck *et al.* 2021).

1.2.3 XYLANE

Xylane, deren Rückgrat aus β -1,4-verknüpften D-Xylopyranoseeinheiten aufgebaut ist, machen bei dikotylen Pflanzen häufig nur einen geringen Teil der Zellwandpolysaccharide aus. Sie sind überwiegend in der Sekundärzellwand in Form von Glucuronoxylanen vorzufinden, bei denen das Xylanrückgrat teilweise über Position O2 mit Glucuronsäure substituiert ist (Ebringerová und Heinze 2000). Bei commeliniden Monokotyledonen sind Xylane die quantitativ bedeutendste Hemicellulosefraktion (Harris und Smith 2006; Scheller und Ulvskov 2010). Bei Vertretern der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) liegen sie häufig in Form von Arabinoxylanen vor, bei denen das Rückgrat über Position O2 und/oder O3 mit teilweise Ferulasäure-substituierten Arabinofuranosylresten verknüpft ist (Lin *et al.* 2021).

1.2.4 MANNANE

Mannane stellen häufig eine Minorfraktion der Zellwandpolysaccharide dar. Sie können jedoch auch als Speicherpolysaccharide dienen und in dieser Funktion beispielsweise in den Samen der Schwarzen Johannisbeere (*Ribes nigrum*) und Roten Johannisbeere (*Ribes rubrum*) die quantitativ dominante Ballaststofffraktion darstellen (Hilz *et al.* 2005; Gidley und Grant Reid 2006; Steck 2020). Das Mannanrückgrat besteht aus β -1,4-verknüpften D-Mannopyranoseeinheiten, die bei Galactomannanen teilweise mit α -1,6-verknüpften D-Galactopyranoseseitenketten substituiert sind. Als Zellwandbestandteil kommen Mannane häufig in Form von (Galacto-) Glucomannanen vor, bei denen in unregelmäßigen Abständen β -1,4-verknüpfte D-Glucopyranoseeinheiten in das Mannanrückgrat eingebaut sind (Ebringerová 2005). Die physikochemischen Eigenschaften wie die Löslichkeit werden durch den Verzweigungsgrad der Mannanketten sowie durch mögliche Acetylierungen der Mannoseeinheiten an Position O2, O3 oder O6 beeinflusst. Unsubstituierte Mannane können sich, ähnlich wie Cellulose, zu hochgeordneten Strukturen mit geringer Löslichkeit zusammenlagern (Kapoor *et al.* 1998; Moreira und Filho 2008).

1.3 STRUKTURELLER AUFBAU VON PEKTINEN

Pektine sind hochkomplexe Heteropolymere, die aus unterschiedlich zusammengesetzten Domänen aufgebaut sind. Die quantitativ bedeutendsten Pektinstrukturen sind üblicherweise Homogalacturonane (HG), Typ I Rhamnogalacturonane (RG-I) und die damit verknüpften neutralen Seitenketten (Arabinane und (Arabino-) Galactane). Die genaue Zusammensetzung der Pektinfraktion ist jedoch vom Ursprungsmaterial (Pflanzenart, Gewebetyp, Reifegrad etc.) abhängig und kann stark variieren.

1.3.1 HOMOGALACTURONANE

HG sind lineare Ketten aus α -1,4-glykosidisch verknüpften D-Galactopyranuronsäureeinheiten, deren Carbonsäuregruppen teilweise methylverestert vorliegen. Das Verhältnis aus methylveresterten Galacturonsäureeinheiten zur Gesamtheit an Galacturonsäureeinheiten wird als Methylierungsgrad bezeichnet. Dieser stellt im industriellen Kontext einen wichtigen Strukturparameter dar und wird teilweise auch mit dem Veresterungsgrad gleichgesetzt. Aus wissenschaftlicher Sicht ist diese Gleichsetzung nicht korrekt, da die Galacturonsäureeinheiten von Pektinen teilweise auch über Position O2 und/oder O3 mit Essigsäure verestert vorliegen können. Dementsprechend wird der Veresterungsgrad in dieser Arbeit als Überbegriff und der Methylierungs- bzw. Acetylierungsgrad als eben jene Begrifflichkeiten verwendet. Die häufige Vernachlässigung der Substitution mit Essigsäure kann darauf zurückgeführt werden, dass der Acetylierungsgrad vieler Pektine vergleichsweise gering ist. Während der Methylierungsgrad von Pektinen häufig im Bereich von 40 - 80 % liegt, ist der Acetylierungsgrad meist im niedrigen

1 Einleitung

einstelligen Prozentbereich. Einige Pektine, wie SBP, können jedoch auch einen deutlich höheren Acetylierungsgrad aufweisen (Schmidt *et al.* 2015b). Neben dem Pflanzenmaterial ist der Methylierungsgrad sowie der Acetylierungsgrad auch stark von den Extraktionsbedingungen abhängig (Levigne *et al.* 2002a). Unterschiede im Methylierungsgrad können unter anderem die Möglichkeit beeinflussen, über die Komplexbildung divalenter Kationen wie Ca^{2+} Verknüpfungspunkte zwischen verschiedenen HG-Abschnitten herzustellen (siehe Abschnitt 1.5.1) und wirken sich dementsprechend auch auf die pflanzenphysiologischen Eigenschaften und Funktionen von Pektinen aus. Beispielsweise werden die im Zuge der Fruchtreifung auftretenden Texturveränderungen zum Teil auf die Verringerung des Methylierungsgrads sowie die Depolymerisierung von HG zurückgeführt (Brummell 2006).

1.3.2 SUBSTITUIERTE GALACTURONANE

Neben HG gibt es auch Galacturonane, bei denen das Rückgrat mit unterschiedlichen Monosacchariden substituiert ist. Bei den **APIOGALACTURONANEN** ist das α -1,4-glykosidisch verknüpfte Galacturonanrückgrat über Position O2 und/oder O3 mit D-Apiose oder Apibiose verknüpft (Hart und Kindel 1970; Longland *et al.* 1989). Das Vorkommen relevanter Mengen an Apiogalacturonanen ist jedoch auf monokotyle Wasserpflanzen beschränkt (Caffall und Mohnen 2009). In Landpflanzen ist hingegen eine Substitution des Galacturonanrückgrats mit D-Xylose häufiger zu beobachten. Bei **XYLOGALACTURONANEN** sind die Xyloseeinheiten über Position O3 glykosidisch mit dem Galacturonanrückgrat verknüpft. Neben monomeren Xyloseeinheiten wurden auch dimere und seltener oligomere D-Xyloseseitenketten mit unterschiedlichen Verknüpfungen (β -1,2-; β -1,3; β -1,4) beschrieben (Le Goff *et al.* 2001; Nakamura *et al.* 2002; Zandleven *et al.* 2006). Die Carbonsäurefunktionen der Galacturonsäureeinheiten können, analog zum HG, methyliert vorliegen. Schols *et al.* (1995) zeigten für Apfelpektine, dass Methylveresterungen unabhängig von der Substitution durch Xyloseeinheiten über das Xylogalacturonanrückgrat verteilt vorliegen. Xylogalacturonane kommen lediglich in bestimmten Pflanzen vor und machen meist nur einen geringen Anteil der Pektinfraktion aus. Beispiele für pflanzliche Materialien, welche einen quantitativ bedeutenden Anteil an Xylogalacturonanen in der Pektinfraktion aufweisen, sind Äpfel, Sojabohnen, Wassermelonen, Erbsen oder Gummi Tragant (Schols *et al.* 1995; Le Goff *et al.* 2001; Nakamura *et al.* 2002; Zandleven *et al.* 2005; Zandleven *et al.* 2006; Mort *et al.* 2008).

Ein weiteres substituiertes Galacturonan ist das **TYP II RHAMNOGALACTURONAN (RG-II)**. Im Gegensatz zu Apiogalacturonanen und Xylogalacturonanen ist RG-II eine ubiquitär vorkommende Pektinfraktion mit hochkonservierter Struktur. Das Rückgrat aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Galacturonsäureeinheiten ist über Position O2 und O3 mit vier Seitenketten substituiert, die aus zwölf teils selten vorkommenden Monosacchariden mit insgesamt 20 unterschiedlichen glykosidischen Bindungstypen aufgebaut sind (Ridley *et al.* 2001; O'Neill *et al.* 2004). Das RG-II-Rückgrat kann ebenso wie bei HG an Position O6 methylverestert vorliegen (Ishii und Matsunaga 2001; Ridley *et al.* 2001). An SBP konnten Ishii und Matsunaga (1996) erstmals nachweisen, dass

RG-II-Einheiten über Boratdiolster dimerisieren können. Die reversiblen RG-II-Verknüpfungen haben vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf die Zellwandfestigkeit und die Expansionsfähigkeit pflanzlicher Zellen und letztendlich auf das Pflanzenwachstum (Ishii *et al.* 1999; O'Neill *et al.* 2001; O'Neill *et al.* 2004).

1.3.3 RHAMNOGALACTURONAN TYP I

Das Rückgrat des RG-I ist aus alternierenden α -1,4-verknüpften D-Galactopyranuronsäure- und α -1,2-verknüpften L-Rhamnopyranoseeinheiten aufgebaut. Die Galacturonsäureeinheiten können, analog zum HG, an Position O2 und/oder O3 acetyliert vorliegen (Komalavilas und Mort 1989; Schols *et al.* 1990; Lerouge *et al.* 1993). Darüber hinaus konnte für Pektine aus Okraschoten gezeigt werden, dass auch die Rhamnoseeinheiten an Position O3 acetyliert sein können (Sengkhamparn *et al.* 2009). Methylester der Galacturonsäureeinheiten des RG-I-Rückgrats sind hingegen seltener, konnten jedoch unter anderem für Pektine aus Tabak und Flachs gezeigt werden (Sun *et al.* 1987; Rihouey *et al.* 1995). Darüber hinaus konnte unter anderem für SBP gezeigt werden, dass die D-Galacturonsäureeinheiten vereinzelt auch über Position O3 mit D-Glucopyranuronsäure substituiert vorliegen können (Renard *et al.* 1999). Über Position O4 der Rhamnoseeinheiten kann das RG-I-Rückgrat mit Seitenketten aus neutralen Monosacchariden substituiert sein, die im Folgenden als „neutrale Seitenketten“ bezeichnet werden. Üblicherweise sind die neutralen Seitenketten aus Arabinanen und (Arabino-) Galactanen zusammengesetzt. Die Zusammensetzung dieser Fraktion kann, ebenso wie der Substitutionsgrad der Rhamnoseeinheiten, je nach Herkunft des Pektins stark variieren. Beispielsweise sind SBP durch hohe Anteile an Arabinanen gekennzeichnet, während Kartoffelpektine meist sehr galactanreich sind (Oosterveld *et al.* 1996; Øbro *et al.* 2004).

ARABINANE sind aus einer α -1,5-glykosidisch verknüpften L-Arabinofuranosekette aufgebaut, die vereinzelt mit β -Arabinofuranosylresten oder β -D-Xylopyranosylresten terminiert sein kann (Cardoso *et al.* 2002; Wefers *et al.* 2015b). Die Arabinanhauptkette kann zudem über Position O2 und/oder O3 mit einzelnen Arabinofuranoseeinheiten oder kurzen, meist α -1,3-verknüpften Arabinofuranoseketten substituiert sein (Yapo 2011b). Wefers *et al.* (2014) konnten zudem nachweisen, dass in den Seitenketten auch β -1,3-Verknüpfungen vorliegen können. Bei Arabinanen aus Zuckerrüben und vielen weiteren Pflanzen stellt Position O3 den Hauptverzweigungspunkt dar (Oosterveld *et al.* 2000a; Voragen *et al.* 2009; Westphal *et al.* 2010a). Einige Arabinane, wie beispielsweise aus Raps, sind hingegen hauptsächlich über Position O2 verzweigt (Eriksson *et al.* 1996). Doppelt substituierte Arabinoseeinheiten machen meist nur einen geringen Teil der Verzweigungen aus. Bei stark verzweigten Arabinanen wie in SBP können auch benachbarte Arabinoseeinheiten mit Seitenketten substituiert sein (Westphal *et al.* 2010b; Wefers *et al.* 2015b).

GALACTANE haben ein Rückgrat aus β -1,4-verknüpften D-Galactopyranoseeinheiten, das über Position O6 mit D-Galactopyranoseeinheiten verzweigt sein kann. Innerhalb des Rückgrats

1 Einleitung

können zudem vereinzelte β -1,3-Verknüpfungen vorliegen (Hinz *et al.* 2005). Galactane werden häufig terminologisch mit Typ I Arabinogalactanen gleichgesetzt, was darauf zurückzuführen ist, dass in der Galactanhauptkette sowohl terminale als auch interne, α -1,4-verknüpfte Arabinopyranosylreste identifiziert werden konnten (Huisman *et al.* 2001; Wefers und Bunzel 2016b). Teilweise werden auch lediglich Galactane, die über Position O3 mit α -L-Arabinofuranosylresten substituiert sind, als Typ I Arabinogalactane bezeichnet. Für die vorliegende Arbeit werden Galactane und Typ I Arabinogalactane unter dem Term **TYP I (ARABINO-) GALACTANE (AG-I)** zusammengefasst.

Neben AG-I gibt es auch Galactane, die ein β -1,3-verknüpftes Rückgrat aufweisen, das an Position O6 mit kurzen, β -1,6-verknüpften D-Galactopyranoseketten verzweigt sein kann. Die Seitenketten können wiederum, unter anderem, mit α -1,3-verknüpften L-Arabinofuranosylresten substituiert und/oder mit kurzen, α -1,5-verknüpften L-Arabinofuranoseketten terminiert sein (Gaspar *et al.* 2001; Redgwell *et al.* 2002). Diese Galactane werden als **TYP II ARABINO GALACTANE (AG-II)** bezeichnet und liegen in Arabinogalactanproteinen (AGP) an Proteine gebunden vor. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob AG-II immer an Proteine gebunden sind oder auch als Seitenketten kovalent mit dem Rückgrat des RG-I verknüpft vorliegen können. Dafür, dass mindestens ein Teil der AGP pektinengebunden vorliegt, spricht jedoch nicht nur, dass AGP chromatographisch nur bedingt von Pektinen zu separieren sind (Voragen *et al.* 2009). Mithilfe bildgebender und anderer analytischer Verfahren konnten unter anderem für SBP, Karotten- und Hopfenpektine Hinweise für kovalente Verknüpfungen der AGP- und Pektindomänen erhalten werden (Oosterveld *et al.* 2002; Immerzeel *et al.* 2006; Kirby *et al.* 2006, 2008).

Sowohl Arabinane als auch (Arabino-) Galactane können mit Hydroxyzimtsäuren verestert vorliegen, wobei das Vorkommen bei dikotylen Pflanzen hauptsächlich auf die Ordnung Caryophyllales beschränkt ist (Hartley und Harris 1981). Zumeist stellt **TRANS-FERULASÄURE** die quantitativ bedeutendste Hydroxyzimtsäuresubstitution dar. Durch die Isolierung und Charakterisierung einer Vielzahl an substituierten Arabinan- und (Arabino-) Galactanoligosacchariden konnte gezeigt werden, dass *trans*-Ferulasäure an Position O2 und O5 der Arabinose- bzw. O6 der Galactoseeinheiten gebunden vorliegen kann (Colquhoun *et al.* 1994; Ralet *et al.* 1994b; Levigne *et al.* 2004a; Bunzel *et al.* 2005b). Über radikalische, oxidative Kopplungsreaktionen können die estergebundenen Ferulasäuren dimerisieren bzw. oligomerisieren und so kovalente, inter- und intramolekulare Quervernetzungen zwischen Pektinen und anderen ferulasäuresubstituierten Zellwandkomponenten ausbilden (Levigne *et al.* 2004b; Ralet *et al.* 2005; Jilek und Bunzel 2013; Wefers *et al.* 2015a; Waterstraat und Bunzel 2019).

1.3.4 MAKROMOLEKULARE PEKTINSTRUKTUR

Der makromolekulare Aufbau von Pektinen ist noch nicht abschließend geklärt. Dies ist neben der Vielzahl an unterschiedlichen Strukturdomänen mit variierender Feinstruktur auch den diskutierten, vielfältigen inter- und intramolekularen Verknüpfungsmöglichkeiten (z.B. Ca^{2+} -

Brücken, RG-II-Boratbrücken, Quervernetzungen über AGP oder Oligoferulasäuren) geschuldet. Neben den Pektin-Pektin-Interaktionen wird die Aufklärung der makromolekularen Struktur von Pektinen auch durch die Einbettung in den Zellwandkomplex erschwert. So werden verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen, aber auch kovalente Verknüpfungen mit anderen Zellwandbestandteilen wie Cellulose oder Xyloglucanen diskutiert (Fry 1986; Carpita und Gibeaut 1993; Zykwinska *et al.* 2005; Zykwinska *et al.* 2007; Zykwinska *et al.* 2008).

Im Laufe der letzten Dekaden wurden verschiedene Modelle postuliert, die die makromolekulare Pektinstruktur abbilden sollen. Das von De Vries *et al.* (1982) entwickelte Modell der „smooth regions“ (HG) und „hairy regions“ (RG-I mit neutralen Seitenketten) geht von einem Pektinrückgrat aus aufeinander abfolgenden Abschnitten aus HG und RG-I aus. Das „smooth and hairy regions“-Modell ist das meist verwendete Pektinmodell, da es mit vielen neueren Studienergebnissen in Einklang gebracht werden kann. So schlussfolgerten Coenen *et al.* (2007) aufgrund der Isolierung entsprechender Oligosaccharide, dass HG- und Xylogalacturonanstrukturen kovalent mit dem RG-I-Rückgrat verknüpft vorliegen können. Ishii und Matsunaga (2001) stellten die Hypothese auf, dass auch RG-II kovalent mit HG verknüpft ist, da RG-II durch Inkubation mit *endo*- α -1,4-D-Polygalacturonase (PGA) aus SBP freigesetzt werden konnte. Daraus wurde die Vorstellung entwickelt, dass die verschiedenen Strukturblöcke im Pektinmolekül aneinandergereiht vorliegen (Abbildung 2).

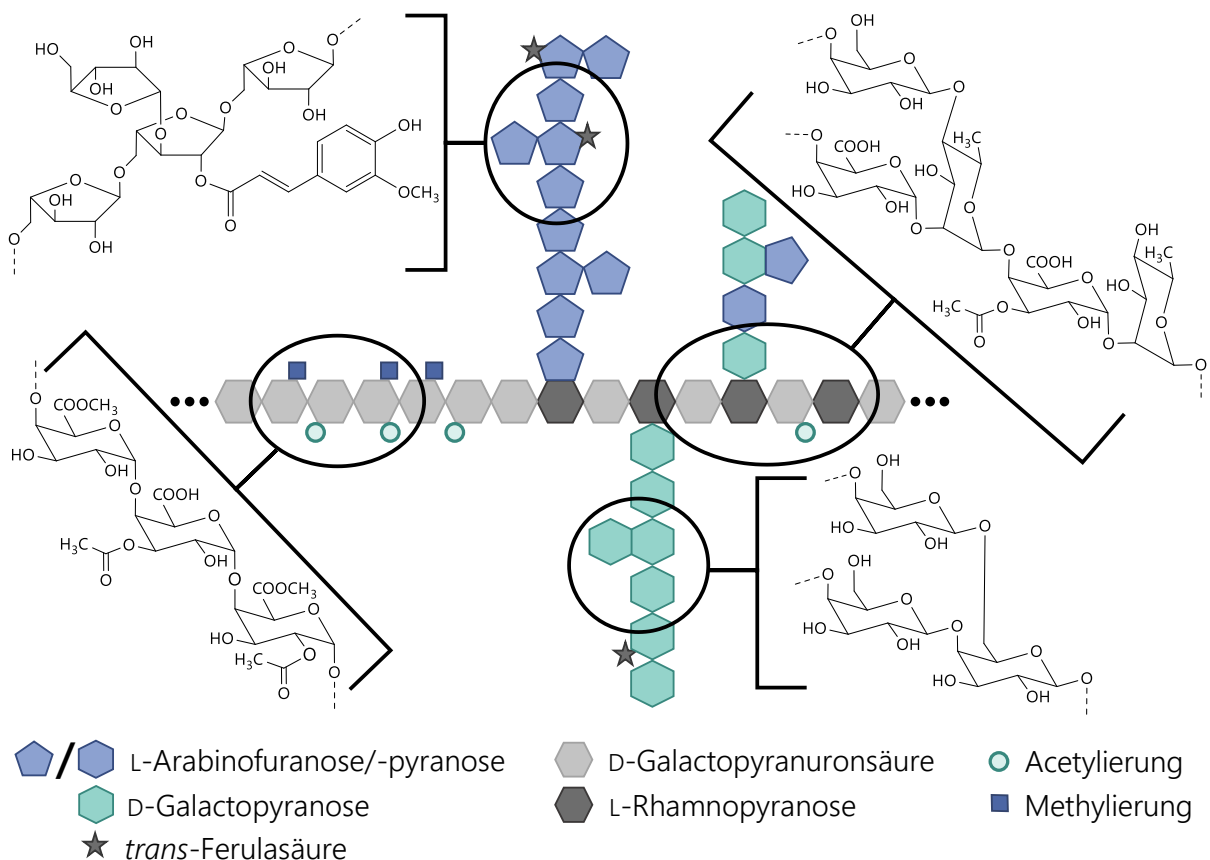


Abbildung 2: Schematischer struktureller Aufbau der Homogalacturonan- und Typ I-Rhamnogalacturonanfraktion eines Zuckerrübenpektins nach dem „smooth and hairy regions“-Modell (De Vries *et al.* 1982)

1 Einleitung

Allerdings gibt es auch Strukturkenntnisse, die nicht mit dem klassischen „*smooth and hairy regions*“-Modell vereinbar sind, weshalb alternative Modelle entwickelt wurden. Insbesondere die Länge und unregelmäßige Verteilung verschiedener HG-Abschnitte führte zur Entwicklung von Modellen, bei denen RG-I das Rückgrat bildet und HG-Abschnitte teilweise oder vollständig als Seitenketten vorliegen (Round *et al.* 2001; Oechslin *et al.* 2003; Vincken *et al.* 2003; Round *et al.* 2010; Yapo 2011a). Doch auch diese Modelle können nicht alle Strukturinformationen in Einklang bringen. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass die tatsächliche makromolekulare Pektinstruktur komplexer ist und nicht durch ein einfaches Modell wiedergegeben werden kann. So könnte es sein, dass in Abhängigkeit vom untersuchten Pektin (Pflanzenart, Reifestadium, Gewebetyp, Lokalisation in der Zellwand) unterschiedliche Strukturen bzw. Elemente aller Modelle in Pektinen vorzufinden sind.

1.4 ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON PEKTINEN

Pektine erfüllen als Zellwandkomponente nicht nur essentielle Funktionen für die Physiologie der Pflanze, sondern wirken auch als Ballaststoffe und weisen im Rahmen dessen vielfältige ernährungsphysiologische Eigenschaften auf (Howlett *et al.* 2010). Obwohl eine ausreichende Ballaststoffzufuhr ein wichtiger Bestandteil der humanen Ernährung ist, wird die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE 2021) empfohlene tägliche Ballaststoffaufnahme für Erwachsene von 30 g/Tag nach den Ergebnissen der vom Max Rubner-Institut durchgeführten „Nationalen Verzehrsstudie II“ in weiten Teilen der Bevölkerung unterschritten (Max Rubner-Institut 2008). Der vermehrte Einsatz von funktionellen Ballaststoffen wie Pektinen in Lebensmitteln könnte dazu beitragen, dieses Defizit auszugleichen.

Nach der Definition der Lebensmittelinformationsverordnung (VO (EU) 1169/2011), die sich an der Definition des Codex Alimentarius orientiert, sind Ballaststoffe natürliche oder synthetische Kohlenhydrate, die aus mindestens drei Monomereinheiten aufgebaut sind, im menschlichen Dünndarm weder verdaut noch resorbiert werden und physiologisch positive Eigenschaften aufweisen. Viele der für Ballaststoffe beschriebenen positiven Effekte gehen vermutlich auf die physikochemischen Eigenschaften zurück. Durch die hohe Wasserbindekapazität wird das Volumen und die Viskosität des Speisebreis im Magen erhöht, was ein Sättigungsgefühl hervorrufen und in einer verlangsamten Magenentleerung resultieren kann. So können Ballaststoffe zu einer verminderten Kalorienaufnahme beitragen. Darüber hinaus kann eine vermehrte Ballaststoffaufnahme auch zu einem geringeren Anstieg des postprandialen Blutglucosespiegels führen, da die Freisetzung und Resorption von Glucose im Dünndarm durch die hohe Viskosität des Speisebreis verzögert wird (Burkitt *et al.* 1972; Holt *et al.* 1979; Kristensen und Jensen 2011). Da Ballaststoffe eine strukturell äußerst heterogene Gruppe an Verbindungen darstellen, können auch die physikochemischen Eigenschaften und die darauf zurückzuführenden ernährungsphysiologischen Effekte unterschiedlich ausfallen. So können Pektine aufgrund ihres teilweise ionischen Charakters Mineralstoffe und Spurenelemente binden, sodass diese nicht im

1.4 Ernährungsphysiologische Eigenschaften von Pektinen

Dünndarm resorbiert werden können. Die Bewertung dieser Eigenschaft ist jedoch davon abhängig, welche Ionen gebunden werden und wie die individuelle Versorgungslage mit den entsprechenden Mineralstoffen und Spurenelementen ist (Baye *et al.* 2017). Zudem werden vermehrt Gallensäuren gebunden, was in deren Neubildung aus Cholesterin und dementsprechend einer Absenkung des Cholesterinspiegels resultieren kann (Jenkins *et al.* 1975; Kendall *et al.* 2010).

Entsprechend der strukturellen Diversität von Ballaststoffen variieren auch die gesundheitsbezogenen Angaben, die nach der „Health Claims“-Verordnung (VO (EU) 432/2012) bei Lebensmitteln mit einem entsprechenden Gehalt der jeweiligen Ballaststoffkomponente getroffen werden dürfen. Für Pektine kann die Aussage getätigt werden, dass sie zur Aufrechterhaltung eines normalen Cholesterinspiegels beitragen und dass der Blutzuckerspiegel nach einer pektinhaltigen Mahlzeit weniger stark ansteigt. Einige der darüber hinaus diskutierten ernährungsphysiologischen Effekte gehen darauf zurück, dass Pektine und andere Ballaststoffe im Dünndarm nicht durch Verdauungsenzyme verstoffwechselt werden und größtenteils intakt in den Dickdarm gelangen. Das in Abhängigkeit von den physikochemischen Eigenschaften der vorliegenden Ballaststoffe entsprechend höhere Volumen und die höhere Viskosität des Speisebreis können zu einer erhöhten Darmperistaltik und so zu einer verkürzten Transitzeit führen (Champ *et al.* 2003; Kendall *et al.* 2010). Andererseits können die Ballaststoffkomponenten teilweise durch das Dickdarmmikrobiom verstoffwechselt werden. Dabei stellen Ballaststoffe eine wichtige Energiequelle für bestimmte Mikroorganismen im Dickdarm dar und können entsprechend deren Wachstum stimulieren. So kann der Verzehr von Ballaststoffen die Quantität und Zusammensetzung des Darmmikrobioms positiv beeinflussen.

Sowohl die Ballaststoffart als auch die Feinstruktur der Polysaccharide beeinflussen, welche Mikroorganismen gefördert werden (Olano-Martin *et al.* 2002). Für Pektine wird von einer positiven Beeinflussung der Darmmikrobiota ausgegangen. Allerdings spiegelt sich die strukturelle Vielfalt von Pektinen auch in einer unterschiedlichen Fermentationsgeschwindigkeit verschiedener Struktureinheiten sowie einer damit einhergehenden variierenden Beeinflussung des Mikrobioms wider (Onumpai *et al.* 2011; Ferreira-Lazarte *et al.* 2018; Larsen *et al.* 2019; Bender *et al.* 2023). Darüber hinaus wirkt sich auch die Feinstruktur (z.B. Kettenlänge, Substituenten, Verzweigungen) auf die Fermentation und die Beeinflussung der Mikrobiotazusammensetzung aus (Holck *et al.* 2011; Thomassen *et al.* 2011; Al-Tamimi *et al.* 2006; Olano-Martin *et al.* 2002).

Einige der relevantesten Stoffwechselprodukte der Darmmikrobiota sind kurzkettige Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat. Diese sind nicht nur die Hauptenergiequelle der Darmepithelzellen, sondern können auch über die Blutbahn in der Leber metabolisiert werden oder nach Passage der Blut-Hirn-Achse einen Einfluss auf das Sättigungsgefühl ausüben (Cummings *et al.* 1987; Frost *et al.* 2014). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Butyrat über verschiedene Mechanismen der Bildung von Dickdarmkrebs entgegenwirken kann (Scharlau *et al.* 2009).

1.5 PEKTINE ALS FUNKTIONELLE LEBENSMITTELZUSATZSTOFFE

Pektine finden aufgrund ihrer Verdickungs-, Stabilisierungs- und Gelbildungseigenschaften Anwendung in einer Vielzahl an Lebensmitteln. Nach VO (EG) Nr. 1333/2008 sind sie als Lebensmittelzusatzstoff E 440 für eine Vielzahl an Anwendungszwecken nach dem *quantum satis*-Prinzip zugelassen. Dabei gibt es verschiedene rechtliche Angaben, die sich auf die Struktur der Pektine beziehen. So sollen sich die eingesetzten Pektine nach VO (EU) Nr. 231/2012 „hauptsächlich aus partiellen Methylestern der Polygalacturonsäure“ zusammensetzen, die aus „geeignetem genusstauglichen pflanzlichen Material, gewöhnlich Zitrusfrüchten und Äpfeln, gewonnen“ werden. Ferner sind verschiedene Spezifikationen zur Zusammensetzung definiert, wie ein Mindestgehalt an Galacturonsäure von 65 % und ein Höchstgehalt an Stickstoff von 1 % (jeweils bezogen auf die aschefreie Trockenmasse).

Diese Spezifikationen basieren auf Pektinen, die aufgrund ihrer gelbildenden oder stabilisierenden Eigenschaften Lebensmitteln zugesetzt werden. Für diesen Zweck werden Pektine benötigt, die einen hohen Galacturonsäure- bzw. HG-Gehalt aufweisen (siehe Abschnitt 1.5.1) (Thakur *et al.* 1997). Derartige HG-reiche Pektine werden üblicherweise mittels harter Extraktionsverfahren aus Apfel- oder Citrustrester gewonnen. Genauere Informationen zur Pektinextraktion und deren Auswirkung auf die Pektinstruktur sind in Abschnitt 3.1 zu finden. Durch die bei der kommerziellen Pektingewinnung vorherrschenden Bedingungen wird unter anderem der Anteil an neutralen Seitenketten deutlich reduziert. Dadurch stehen die rechtlichen Spezifikationen insbesondere bei Pektinen, die strukturell komplexer aufgebaut sind als unter industriellen Bedingungen extrahierte Apfel- und Citruspektine, im Widerspruch zur nativ in der Pflanze vorliegenden Pektinstruktur. Zum Beispiel weisen SBP unter anderem einen hohen Gehalt an Arabinan- und (Arabino-) Galactan-Seitenketten sowie an Proteinen auf, sodass diese nur bei starker Modifikation den genannten Anforderungen für Pektin als Lebensmittelzusatzstoff genügen. Der im Vergleich zu Apfel- und Citruspektinen deutlich höhere Acetylierungsgrad sowie die Substitution der neutralen Seitenketten mit *trans*-Ferulasäure sprechen hingegen nicht gegen einen Einsatz als Lebensmittelzusatzstoff „Pektin“, da diese Strukturparameter in den entsprechenden Verordnungen nicht spezifiziert sind.

Ein Anwendungsbeispiel für Pektin als Lebensmittelzusatzstoff ist die Stabilisierung von angesäuerten Milchgetränken, um eine Proteinagglomeration und Phasentrennung im Zuge der Lagerung zu verhindern (Willats *et al.* 2006). Besonders relevant sind jedoch die Gelbildungseigenschaften von Pektinen, die in Konfitüren, Marmeladen und verwandten Erzeugnissen genutzt werden und für die Textur des Lebensmittels unerlässlich sind.

1.5.1 PEKTINE ALS GELBILDNER

Die Fähigkeit von Pektinen, Gele auszubilden, wurde bereits 1825 von Henri Braconnot beschrieben, der auch die Bezeichnung Pektin geprägt hat (Willats *et al.* 2006). Für die Pektin-

vermittelte Gelbildung sind verschiedene Mechanismen bekannt. Die beiden meistgenutzten Mechanismen beruhen auf Pektinen, die einen hohen Anteil an HG-Abschnitten aufweisen, und unterscheiden sich darin, ob die Galacturonsäureeinheiten einen niedrigen oder hohen Grad an Methylveresterungen aufweisen (Thakur *et al.* 1997). Bei Pektinen mit einem niedrigen Methylierungsgrad (etwa 25 - 50 %) kann die Gelbildung durch Zugabe von Calciumsalzen erfolgen. Dissoziierte Carboxygruppen von nicht-methylveresterten Galacturonsäureeinheiten können dabei durch Komplexbildung mit Ca^{2+} -Ionen miteinander verknüpft werden, sodass ein mehrdimensionales Netzwerk ausgebildet wird, das häufig mit dem *egg-box*-Modell beschrieben wird (Grant *et al.* 1973; Morris *et al.* 1982). In den nicht-komplexierten Bereichen des Pektinnetzwerks kann Wasser angelagert werden. Pektine mit einem hohen Grad an Methylveresterungen (etwa 50 - 75%) können Gele über nicht-ionische Wechselwirkungen ausbilden, sofern ein niedriger pH-Wert sowie eine hohe Konzentration an gelösten Mono- oder Disacchariden vorliegen. Der ionische Charakter der HG-Ketten ist durch den hohen Grad an Methylveresterungen sowie den niedrigen pH-Wert verringert, was eine Zusammenlagerung der eher unpolaren, methylveresterten Bereiche ermöglicht. Die hohe Konzentration an gelösten Mono- oder Disacchariden verbessert die Gelbildung, da weniger Wasser für Wechselwirkungen mit den Pektinmolekülen zur Verfügung steht (Thakur *et al.* 1997).

SBP weisen bei den genannten Mechanismen schlechtere Geliereigenschaften auf als beispielsweise Apfel- und Citruspektine, was unter anderem auf geringere HG-Anteile sowie sterische Effekte, die durch höhere Anteile an RG-I und neutralen Seitenketten bedingt sind, zurückzuführen ist. SBP können dennoch stabile Gele ausbilden, indem die Substitution der neutralen Seitenketten mit Ferulasäure ausgenutzt wird. Ferulasäureester können mithilfe von Enzymen unter oxidativen Bedingungen radikalisch gekoppelt werden, z.B. mittels Peroxidase und Wasserstoffperoxid oder mittels Laccase und Sauerstoff. Dadurch können mehrdimensionale Netzwerke mit guten Gelbildungseigenschaften ausgebildet werden, die im Gegensatz zu nicht-kovalenten Gelen eine hohe Toleranz gegenüber pH-Schwankungen oder Elektrolyten aufweisen (Oosterveld *et al.* 2000c; Junker *et al.* 2021).

1.5.2 PEKTINE ALS EMULGATOREN

1.5.2.1 EMULSIONEN

Emulsionen sind Systeme, die aus mindestens zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten bestehen und von denen eine Flüssigkeit (disperse Phase) in der anderen Flüssigkeit (kontinuierliche Phase) dispergiert ist. Bei Lebensmitteln sind Öl-in-Wasser (o/w)-Emulsionen weit verbreitet. Beispiele für (o/w)-Emulsionen sind Milch, Sahne, Mayonnaise oder Aromaölemulsionen in Erfrischungsgetränken. Beim Erzeugen einer Emulsion wird die disperse Phase bei hohen Energieeinträgen zerkleinert, sodass Tropfen der dispersen Phase in der kontinuierlichen Phase verteilt vorliegen. Hierzu können verschiedene Emulgiermaschinen verwendet werden, wobei im industriellen Kontext häufig Kolloidmühlen und Hochdruckhomogenisatoren Anwendung finden

1 Einleitung

(Karbstein und Schubert 1995). Die Wahl der Emulgiermethodik wirkt sich auf die Tropfengrößen der dispersen Phase und damit darauf aus, wie stark die Öl-Wasser-Grenzfläche vergrößert wird. Je nach Tropfengröße werden Emulsionen häufig in Makroemulsionen ($> 1 \mu\text{m}$), Mikroemulsionen ($0,1 - 1 \mu\text{m}$) und Nanoemulsionen ($< 0,1 \mu\text{m}$) unterschieden. Die vorliegenden Tropfengrößen bzw. deren Verteilung ist ein maßgeblicher Parameter für die Bewertung einer Emulsion, da sich dieser auf die Emulsionsstabilität und das optische Erscheinungsbild eines Lebensmittels (z.B. Trübung) auswirken können. In Lebensmittelanwendungen sind vor allem Makro- und Mikroemulsionen von Bedeutung (Bibette *et al.* 1999; Ozturk und McClements 2016; McClements 2016).

Die Tropfengrößenverteilung einer Emulsion ist jedoch, neben der zur Herstellung verwendeten Emulgiermethodik, auch entscheidend vom Vorhandensein sowie der Art und Konzentration grenzflächenaktiver Verbindungen, den Emulgatoren, abhängig. Ohne Emulgatoren würde es nach der Tropfenzerkleinerung aufgrund der thermodynamischen Instabilität und dem Bestreben des Systems, die Grenzfläche zu minimieren, schnell wieder zu einer vollständigen Phasentrennung kommen. Emulgatoren können diesen Prozess verhindern oder zumindest verlangsamen, indem sie an die Öl-Wasser-Grenzfläche adsorbieren und die Oberflächenspannung herabsetzen. Die Verhältnisse und Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Strukturkomponenten innerhalb des Moleküls entscheiden darüber, wie effektiv der Emulgator an die Grenzfläche adsorbieren kann. Um die gerade aufgebrochenen Tropfen effektiv zu stabilisieren und vor Aggregation zu schützen, müssen Emulgatoren jedoch auch schnell und in ausreichender Zahl an die Grenzfläche adsorbieren. Aufgrund der höheren Diffusionsgeschwindigkeit können niedermolekulare Emulgatoren (z.B. Tenside) tendenziell schneller an die Grenzfläche gelangen als hochmolekulare Emulgatoren (z.B. Proteine oder Pektine). Hochmolekulare Emulgatoren haben jedoch den Vorteil, dass die Grenzfläche unter anderem aufgrund sterischer Effekte besser stabilisiert wird. Neben Aspekten wie der adsorbierten Schichtdicke spielen auch elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Tropfenstabilisierung. Während niedermolekulare Emulgatoren einlagige Schichten an der Grenzfläche ausbilden, können Makromoleküle wie SBP auch mehrlagige Schichten um die Tropfen ausbilden, was das Auftreten von Koaleszenz unwahrscheinlicher macht und in einer erhöhten Emulsionsstabilität resultiert (Siew *et al.* 2008; Tadros 2013). Für die Herstellung stabiler Emulsionen ist neben den genannten Aspekten auch deren Formulierung von entscheidender Bedeutung. Die Emulgatorkonzentration, das Verhältnis von kontinuierlicher zu disperser Phase, der pH-Wert, die Viskosität, Salze und Hitzebehandlungen (z.B. Pasteurisation) wirken sich teilweise deutlich auf die Tropfengrößen sowie die Emulsionsstabilität aus (Bindereif *et al.* 2022). Für die Emulgiereigenschaften von Makromolekülen wie SBP ist jedoch auch die molekulare Struktur ein entscheidender Faktor.

1.5.2.2 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN PEKTINSTRUKTUR UND EMULGIEREIGENSCHAFTEN

Wie bereits erwähnt, können Pektine in Abhängigkeit des zur Extraktion verwendeten pflanzlichen Rohstoffs gute Emulgierereigenschaften aufweisen. Insbesondere SBP weist im Vergleich zu Citrus- oder Apfelpektin sehr gute emulsionsstabilisierende Eigenschaften auf. Daher werden die bisherigen Untersuchungen zu den Zusammenhängen zwischen der Struktur und den Emulgierereigenschaften hauptsächlich anhand von SBP erläutert. Die Struktur von SBP zeichnet sich neben einem hohen Anteil an AGP und neutralen Seitenketten (insbesondere Arabinane), die zudem teilweise mit *trans*-Ferulasäure verestert vorliegen, auch durch einen hohen Acetylierungsgrad aus. Der Einfluss dieser und weiterer Strukturelemente auf die Emulgierereigenschaften von SBP wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht.

Oftmals wurde der hohe AGP- bzw. Proteingehalt von SBP als wichtiger Faktor für die Emulgierereigenschaften hervorgehoben (Leroux *et al.* 2003; Williams *et al.* 2005; Siew und Williams 2008; Chen *et al.* 2016b; Liu *et al.* 2019). Die Erklärung hierfür ist der teilweise hydrophobe Charakter der Proteinfraction, der eine Anlagerung des Pektinkomplexes an die Öltröpfchen einer Emulsion ermöglicht (Funami *et al.* 2007; Funami *et al.* 2011). So konnte für SBP bereits gezeigt werden, dass die Fraktionen, die an die Ölphase angelagert sind, unter anderem durch erhöhte Proteinkonzentrationen gekennzeichnet sind (Williams *et al.* 2005). Der positive Einfluss erhöhter Proteingehalte wurde dadurch bekräftigt, dass die Emulgierereigenschaften von SBP durch die kovalente Quervernetzung mit exogenen Proteinen verbessert werden konnten (Qi *et al.* 2017; Wefers *et al.* 2018; Guo *et al.* 2018; Lin *et al.* 2020a). Jedoch konnte unter anderem anhand der Analyse unterschiedlicher SBP-Fraktionen gezeigt werden, dass der Zusammenhang zwischen Proteingehalt und Emulgierereigenschaften nicht eindeutig ist (Williams *et al.* 2005). Vermutlich spielt neben dem Proteingehalt auch die Art der Verknüpfung der Protein- mit den Polysaccharidkomponenten eine wichtige Rolle für die Emulgierereigenschaften (Chen *et al.* 2016b).

Neben der Proteinfraction wird häufig die Substitution der neutralen Seitenketten mit *trans*-Ferulasäure als ein relevanter Faktor für die im Vergleich zu Citrus- und Apfelpektinen besseren Emulgierereigenschaften von SBP genannt (Siew und Williams 2008; Chen *et al.* 2016a). Die Substitution mit *trans*-Ferulasäure erhöht die Hydrophobizität der entsprechenden Strukturelemente und ermöglicht so wiederum eine Interaktion mit der Öl-Wasser-Grenzfläche (Siew und Williams 2008). Funami *et al.* (2011) schlussfolgerten jedoch, dass die assoziierten Proteine eine deutlich wichtigere Rolle als hydrophober Anker darstellen. Williams *et al.* (2005) hoben insbesondere die strukturelle Anordnung von proteinhaltigen und mit *trans*-Ferulasäure veresterten Strukturen als entscheidenden Faktor für die Emulgierereigenschaften hervor.

Eine weitere hydrophobe Modifikation stellt die Methylierung und Acetylierung der (Rhamno-) Galacturonfraktionen dar. Erhöhte Acetylgehalte der an die Ölphase adsorbierten Pektinfraktion konnten bereits nachgewiesen werden, weshalb von einem Einfluss des Acetylierungsgrads auf die Emulgierereigenschaften von SBP ausgegangen wird (Leroux *et al.* 2003). Jedoch konnte durch Deacetylierungsstudien ein im Vergleich zu anderen

1 Einleitung

hydrophobizitätsbeeinflussenden Strukturkomponenten wie Proteinen oder *trans*-Ferulasäure lediglich moderater Effekt auf die stabilisierte Tropfengröße festgestellt werden (Leroux *et al.* 2003; Chen *et al.* 2016a). Ai *et al.* (2022) konnten jedoch zeigen, dass eine Acetylierung zuvor durch alkalische Behandlung fast vollständig deacetylierter SBP mit einer deutlichen Verbesserung der Emulgierereigenschaften einhergeht. Zudem konnte bei Emulsionen, die durch acetylreiche Pektine stabilisiert wurden, eine verbesserte Langzeitstabilität beobachtet werden. Neben der Hydrophobizitätsänderung ist dies vermutlich auch auf eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Ca^{2+} -vermittelten Flockungsreaktionen zurückzuführen, was ebenfalls für Pektine mit einem hohen Methylierungsgrad gezeigt wurde (Leroux *et al.* 2003; Chen *et al.* 2016a). Weitere Studien zum Einfluss erhöhter Methylierungsgrade auf die Emulgierereigenschaften von Pektinen wurden unter anderem für Citruspektine (Schmidt *et al.* 2015a; Schmidt *et al.* 2015b) und SBP (Chen *et al.* 2016b; Chen *et al.* 2016a) durchgeführt. Als zugrundeliegender Mechanismus wird diskutiert, dass durch einen erhöhten Methylierungsgrad der ionische Charakter des Pektinrückgrats abgeschwächt wird, da nicht-methylveresterte Carbonsäuregruppen bei den gewählten Emulgierbedingungen (pH 5) weitgehend dissoziiert vorliegen. Dies wirkt sich nicht nur auf die bereits hervorgehobene Empfindlichkeit gegenüber Ca^{2+} -vermittelten Flockungsreaktionen, sondern auch auf die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen sowie die räumliche Anordnung der Moleküle aus (Axelos und Thibault 1991; Leroux *et al.* 2003).

Neben den hydrophoben Strukturelementen haben verschiedene Autoren den neutralen Pektinseitenketten einen positiven Einfluss auf die Emulgierereigenschaften zugeschrieben, wobei die Stabilisierung der Öltröpfen durch die Ausbildung einer ausgeprägten Hydrathülle als zugrundeliegender Mechanismus angenommen wird (Siew und Williams 2008; Funami *et al.* 2011). Während über den positiven Effekt höherer Anteile an neutralen Seitenketten auf die Langzeitstabilität von Emulsionen weitgehend Einigkeit vorherrscht, gibt es über die spontane Emulgieraktivität unterschiedliche Berichte. Für SBP wird meist von einem mäßigen Einfluss des Anteils neutraler Seitenketten ausgegangen (Funami *et al.* 2011; Chen *et al.* 2016a; Zhou *et al.* 2021). Für Okrapektine machten Kpodo *et al.* (2018) allerdings einen negativen Einfluss hoher Neutralzuckeranteile aus. Der individuelle Einfluss galactosehaltiger bzw. arabinosehaltiger Pektinseitenketten wurde in der Literatur noch nicht tiefergehend untersucht. Lediglich Chen *et al.* (2016a) sowie Funami *et al.* (2011) untersuchten kommerzielle SBP vor und nach enzymatischer Arabinan- bzw. Galactanabspaltung. Dabei konnte jedoch weder ein stark ausgeprägter noch ein unterschiedlich gearteter Einfluss der Arabinan- bzw. Galactanfraktion ausgemacht werden.

Zusätzlich zu den genannten Strukturparametern wird auch häufig die Molekulargewichtsverteilung bzw. das mittlere Molekulargewicht als wichtiger Einflussfaktor für die Emulgierereigenschaften von Pektinen diskutiert (Williams *et al.* 2005; Yapo *et al.* 2007b). Dem zugrunde liegt, dass sich das Molekulargewicht nicht nur auf die Diffusionsgeschwindigkeit im Zuge der Anlagerung an die Öltröpfen auswirkt, sondern auch die sterische Stabilisierung der Öl-Wasser-Grenzfläche beeinflusst. Während der positive Einfluss höherer Molekulargewichte auf die Emulsionsstabilität vielfach belegt werden konnte, sind die Auswirkungen auf die initial erzeugte Emulsionstropfengröße nicht eindeutig geklärt. So konnten nach Einsatz von SBP, deren mittleres

Molekulargewicht durch unterschiedlich geartete Quervernetzungsreaktionen erhöht wurde, im Vergleich zu den jeweiligen unmodifizierten SBP sowohl niedrigere als auch höhere Tropfendurchmesser festgestellt werden (Jung und Wicker 2012; Zhang *et al.* 2015; Lin *et al.* 2020b; Wang *et al.* 2021).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die aktuelle Studienlage keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Zusammenhänge zwischen Struktur und Emulgierereigenschaften von SBP oder anderen Pektinen zulässt. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass in den aufgeführten Studien fast ausschließlich kommerzielle Pektine untersucht wurden. Da diese Pektine durch die harschen Extraktionsbedingungen stark modifiziert werden (siehe Abschnitt 3.1), sind bei diesem Studiendesign keine Rückschlüsse über den Einfluss der bereits im Zuge der Extraktion modifizierten bzw. abgespaltenen Strukturelemente möglich. Beispielsweise ist wenig über die Emulgierereigenschaften seitenkettenreicher Pektine oder die Auswirkungen unterschiedlicher Verhältnisse von neutralen Seitenketten zu Galacturonanstruktureinheiten bekannt. So könnten verschiedene Zusammensetzungen der Polysaccharidfraktion Unterschiede in der räumlichen Flexibilität des Polymers bewirken und dementsprechend Einfluss auf die Grenzflächenaktivität haben (Axelos und Thibault 1991). Demnach gibt es bisher kein umfassendes Bild über die Struktur-Eigenschaftszusammenhänge von SBP.

2 ZIELSETZUNG

Die Herstellung emulsionsbasierter Lebensmittel erfordert den Einsatz von Emulgatoren. Aufgrund der steigenden Nachfrage nach nachhaltigen und regionalen Produkten ist die Lebensmittelindustrie auf der Suche nach Alternativen zu bewährten Emulgatoren wie z.B. Gummi arabicum. Pektine, die in Deutschland bereits seit den 1930er Jahren kommerziell aus Nebenprodukten der Lebensmittelindustrie extrahiert werden, können diese Anforderungen potentiell erfüllen. Allerdings weisen Apfel- und Citruspektine, die den überwiegenden Teil der kommerziell extrahierten Pektine ausmachen, nur mäßige Emulgiereigenschaften auf. Dagegen besitzen Pektine aus anderen pflanzlichen Rohstoffen deutlich bessere emulsionsstabilisierende Eigenschaften, was für Zuckerrübenpektine (*sugar beet pectins*, SBP) bereits in den 1980er Jahren gezeigt werden konnte (Dea und Madden 1986). Die Kommerzialisierung von emulsionsstabilisierenden SBP wird jedoch unter anderem dadurch gehemmt, dass die Zusammenhänge zwischen der chemischen Struktur und den Emulgiereigenschaften nur unzureichend aufgeklärt sind. Neben der ausgesprochen hohen strukturellen Komplexität von SBP ist dieser Umstand auch darauf zurückzuführen, dass bisherige Studien zu Struktur-Eigenschaftsbeziehungen meist auf einer geringen Anzahl an untersuchten Pektinen basierten oder lediglich die Auswirkungen einzelner Strukturveränderungen analysiert wurden. Zudem wurden fast ausschließlich unter harschen Bedingungen extrahierte Pektine betrachtet, sodass keine Kenntnisse über die Struktur-Eigenschaftsbeziehungen wenig modifizierter SBP vorliegen. Für ein umfassendes Bild über die Zusammenhänge zwischen den Extraktionsbedingungen, den Emulgiereigenschaften und der Polymerstruktur ist es dementsprechend unerlässlich, dass eine hohe Anzahl an SBP mit einer möglichst hohen strukturellen Variabilität untersucht wird.

Ziel dieser Arbeit ist daher die systematische und umfängliche Erfassung des Einflusses der verschiedenen Pektinstrukturelemente auf die Emulgiereigenschaften von SBP. In Kombination mit detaillierten Erkenntnissen zur Beeinflussung der Molekülstruktur durch den Extraktionsprozess können auf diese Weise vielversprechende Extraktionsmethoden identifiziert werden, die in SBP mit verbesserten Emulgiereigenschaften resultieren und so die potentielle Wertschöpfung des Rohstoffs Zuckerrübenschnitzel vorantreiben. Zudem sollen weitere, bisher wenig wertgeschöpfte pflanzliche Industrienebenströme auf ihr Potential zur Gewinnung von emulsionsstabilisierenden Pektinen überprüft werden.

In einem ersten Schritt sollen unterschiedliche Methoden zur Pektinextraktion etabliert und insbesondere die Probenaufarbeitung insofern optimiert werden, dass für die Analyse der Molekülstruktur und der Emulgiereigenschaften hinreichende Ausbeuten erzielt werden. Daraufhin können durch die Variation der Extraktionsparameter Zeit und pH-Wert eine Vielzahl strukturell diverser SBP extrahiert werden, die die Basis zur Ergründung der funktionellen Zusammenhänge zwischen der Extraktion, der Struktur und den Eigenschaften darstellen. Da bisherige Studien nicht auf die Extraktion seitenkettenreicher SBP abgezielt haben, liegt ein besonderes Augenmerk auf den Parameterkombinationen, die hohe Pektinausbeuten bei

2 Zielsetzung

gleichzeitig nur geringfügiger Modifikation der Pektinstruktur ermöglichen. In diesem Zuge sollen auch alternative Extraktionsverfahren zur traditionellen Säureextraktion auf ihr Potential zur Extraktion von SBP mit guten Emulgiereigenschaften untersucht werden. Anschließend soll eine detaillierte Strukturcharakterisierung der extrahierten Pektine erfolgen, um die Auswirkungen unterschiedlicher Prozessbedingungen auf die Polymerstruktur aufzuzeigen und so die gezielte Extraktion von SBP mit bestimmten strukturellen Zusammensetzungen zu ermöglichen. Über die Herstellung und Analyse von Modellemulsionen werden die Emulgiereigenschaften der extrahierten SBP ermittelt und in Relation zur jeweiligen Molekülstruktur gesetzt. Die auf diese Weise gewonnenen Struktur-Eigenschaftserkenntnisse sollen durch die gezielte Modifikation einzelner Strukturelemente eines seitenkettenreichen SBP überprüft und konkretisiert werden. Die Kombination dieser unterschiedlichen methodischen Ansätze sollte demnach ein umfassendes Bild über die ursächlichen Struktur-Eigenschaftszusammenhänge von SBP ermöglichen.

Durch die Extraktion und Analyse von Pektinen aus weiteren regional anfallenden, pflanzlichen Industrienebenprodukten wie Weintraubentrester soll zum einen deren Potential als Ausgangsmaterial zur Extraktion von Pektinen mit guten Emulgiereigenschaften eruiert werden. Zum anderen soll überprüft werden, ob die für SBP ermittelten Struktur-Eigenschaftszusammenhänge auch auf andere Pektine übertragen werden können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PEKTINEXTRAKTION

3.1.1 VERWENDETE ROHSTOFFE

Die Extraktion von Pektinen erfolgte in dieser Arbeit aus Zuckerrübenschnitzeln, Weintraubentrester, Kartoffelpülpe, Karotten-, Apfel- und Citrustrester. Gekalkte Zuckerrübenschnitzel, die im Zuge der industriellen Zuckergewinnung als Nebenprodukt anfallenden Extraktionsrückstände, wurden im Rahmen des AiF Projekts 20218 N von der Südzucker AG (Mannheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Weintraubentrester der Rebsorten Riesling und Müller-Thurgau wurde von der Baden-Badener-Winzergenossenschaft (Baden-Baden, Deutschland), Trester der Rebsorten Silvaner und Muskateller vom Weingut Jürgen Bernhard (Udenheim, Deutschland) bereitgestellt. Apfel- und Citrustrester wurden von der Herbstreith & Fox GmbH & Co. KG (Neuenbürg, Deutschland), Kartoffelpülpe von der Emsland-Stärke GmbH (Emlichheim, Deutschland) und Karottentrester von der GNT Europe GmbH (Aachen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Diese Rohstoffe wurden ausgewählt, da es sich um regional in großen Mengen anfallende, pflanzliche Industrienebenprodukte handelt.

Zuckerrübenschnitzel, Kartoffelpülpe, Karotten-, Apfel- und Citrustrester wurden in getrockneter Form angeliefert. Um einen enzymatischen Pektinabbau während der Lagerung zu vermeiden, wurden die Weintraubentrester der unterschiedlichen Rebsorten umgehend nach Ernte und Pressung der Weintrauben (Oktober 2018 (Riesling und Müller-Thurgau) bzw. Oktober 2019 (Silvaner und Muskateller)) tiefgefroren und am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik des Karlsruher Instituts für Technologie gefriergetrocknet. Zur Erhöhung der Extraktionseffizienz wurden die Rohstoffe vor der Pektinextraktion standardmäßig mit einer Rotorschnellmühle zerkleinert. Zur Vermeidung übermäßiger Erwärmung erfolgte dabei zunächst eine Zerkleinerung der Ausgangsmaterialien auf Partikeldurchmesser < 2 mm, bevor in einem zweiten Mahlgang auf die Zielgröße von < 0,5 mm gemahlen wurde. Davon ausgenommen ist der Karottentrester, der bereits in gemahlener Form vorlag (Partikelgrößenbereich: 0,14 - 0,20 mm). Die getrockneten und gemahlene Rohstoffe wurden bei Raumtemperatur in luftdichten Behältern unter Ausschluss von Sonnenlicht gelagert.

3.1.2 EXTRAKTIONSMETHODEN

Die Extraktion von Pektinen aus pflanzlichen Rohstoffen setzt voraus, dass die Pektine aus dem Zellwandkomplex herausgelöst werden. Hierzu ist aufgrund der Vielzahl an teils starken Interaktionen mit anderen Zellwandbestandteilen ein hoher Energieeintrag und/oder der Einsatz von Chemikalien bzw. Enzymen vonnöten. Dementsprechend beruhen die Extraktionsverfahren

3 Material und Methoden

häufig auf der Erwärmung der wässrigen Extraktionssuspension auf Temperaturen von 75 - 95 °C. Bei Säureextraktionen wird zusätzlich der pH-Wert durch Zugabe starker Mineralsäuren (z.B. Salzsäure, Salpetersäure) auf Werte von etwa 1 bis 2 abgesenkt, was das Auflösen der Wechselwirkungen zwischen Pektinen sowie zwischen Pektinen und anderen Zellwandkomponenten zur Folge hat (Levigne *et al.* 2002a; Ma *et al.* 2013). Die dadurch verstärkte Pektinfreisetzung ist jedoch auch auf die Spaltung glykosidischer Bindungen innerhalb der Pektinfraktion zurückzuführen, wobei insbesondere die neutralen Seitenketten anfällig für säurehydrolytische Modifikationen sind (BeMiller 1967; Levigne *et al.* 2002a; Ralet und Thibault 1994). Bisher wurde die partielle Hydrolyse der Arabinan- und Galactanfraktion aus industrieller Sicht positiv bewertet, da Pektine hauptsächlich aufgrund ihrer gelbildenden Eigenschaften in Lebensmitteln eingesetzt werden und sich erhöhte Anteile neutraler Seitenketten negativ auf diese funktionelle Eigenschaft auswirken (Ralet *et al.* 1994a; Thakur *et al.* 1997). Dementsprechend stellen harsche Säureextraktionsverfahren die kommerziell meistgenutzte Variante dar. Neben den guten Gelbildungs- und Verdickungseigenschaften der extrahierten Pektine haben Säureextraktionsverfahren weitere Vorteile, wie einen niedrigen instrumentellen Aufwand, die Möglichkeit eines kontinuierlichen Betriebes und die hohen erzielbaren Pektinausbeuten. Dabei ist insbesondere die Pektinausbeute ein entscheidender Parameter, da hinreichende Ausbeuten sowohl für die labortechnische als auch die wirtschaftliche Nutzung eine Grundvoraussetzung darstellen. Die Pektinausbeute variiert in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial, der Extraktionsmethode sowie den Extraktionsbedingungen. Hohe Ausbeuten werden üblicherweise durch harschere Bedingungen (hohe Temperatur, niedriger pH-Wert, lange Extraktionszeit) erzielt, die jedoch wie bereits beschrieben auch mit einer verstärkten Pektinmodifikation einhergehen (Levigne *et al.* 2002a; Colodel *et al.* 2018).

Alternativ zum Säureextraktionsverfahren können Pektine bzw. bestimmte Pektinfraktionen auch durch alkalische Extraktion gewonnen werden. Dies ermöglicht die Extraktion von Pektinen mit geringer modifizierten Arabinanen und Galactanen, bedingt jedoch auch eine Abnahme des Veresterungsgrads (Methyl-, Acetyl-, Ferulasäureveresterungen) sowie eine Spaltung des Galacturonanrückgrats über eine β -Eliminierungsreaktion (Rombouts und Thibault 1986). Auch die Pektinextraktion mittels Autoklavenbehandlung bei 121 °C im leicht sauren Milieu (~pH 5) kann zu Spaltungen innerhalb des Galacturonanrückgrats über einen β -Eliminierungsmechanismus führen. Im Gegensatz zu alkalischen Verfahren wird jedoch der Veresterungsgrad nicht wesentlich modifiziert (Oosterveld *et al.* 1996). In Kombination mit den hohen Ausbeuten bei kurzen Extraktionszeiten stellen Autoklavenbehandlungen demnach eine vielversprechende Methode dar, um Pektine mit einem hohen Gehalt an neutralen Seitenketten zu extrahieren. Andere Verfahren wie chelatbildnerunterstützte Extraktionen, Ultraschallbehandlungen oder Extraktionen mit pektinolytischen Enzymen können ebenfalls Auswirkungen auf die Pektinstruktur haben, die sich auf die funktionellen Eigenschaften auswirken können und dementsprechend beachtet werden müssen (Oosterveld *et al.* 1996; Chen *et al.* 2015; Abou-Elseoud *et al.* 2021). Eine theoretische Möglichkeit zur Extraktion von möglichst nativen Pektinen wäre die Behandlung mit spezifischen Enzymen, die ausschließlich andere

Zellwandbestandteile wie Cellulose spalten und so eine Freisetzung der Pektine aus dem Zellwandkomplex ermöglichen.

Aufgrund der hohen Relevanz liegt auch der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Extraktion von Pektinen mittels Säurebehandlung bei 80 °C. Allerdings sollen durch variierende Extraktionsbedingungen neben stark modifizierten Pektinen auch gering modifizierte und damit möglichst native Pektine erhalten werden. Da geringe Pektinmodifikationen üblicherweise mit geringen Ausbeuten einhergehen, werden in dieser Arbeit auch kombinierte Verfahren eingesetzt, die in einer verstärkten Pektinfreisetzung resultieren sollen: zum einen durch die Komplexbildung von Ca^{2+} -Ionen durch Citronensäurezugabe, zum anderen durch die enzymatische Spaltung von anderen Zellwandpolysacchariden wie Cellulose. Ein Vorteil einer möglichst vollständigen Pektinextraktion bei gleichzeitig nur geringfügiger Modifikation der Struktur ist zudem, dass Rückschlüsse über die nativ vorliegende Pektinstruktur ermöglicht werden, da die Diskriminierung bestimmter Pektinfraktionen vermieden wird. Als alternative Extraktionsmethodik wird zudem die Autoklavenbehandlung eingesetzt, bei der die Pektinfreisetzung bei erhöhtem Druck (2 bar) durch erhöhte Temperaturen (121 °C) erreicht wird. Im Vergleich zur Säureextraktion konnten so bereits bei kürzeren Extraktionszeiten hohe Pektinausbeuten erzielt werden (Oosterveld *et al.* 1996; Oosterveld *et al.* 2000a). Zudem kann auf die Säurezugabe verzichtet werden, sodass der Chemikalieneinsatz reduziert und die Probenaufarbeitung vereinfacht wird.

Die Entwicklung der zur Extraktion genutzten Methoden inklusive der Probenvorbereitung, der anschließenden Präzipitation und der weiteren Probenaufarbeitung werden in Abschnitt 4.1 beschrieben. Die allgemeinen Arbeitsvorschriften zur Pektinextraktion sind in Abschnitt 8.1 zu finden.

3.2 STRUKTURCHARAKTERISIERUNG DER EXTRAHIERTEN PEKTINE

Eine detaillierte und möglichst umfassende Analyse der strukturellen Zusammensetzung der extrahierten Pektine ist Grundvoraussetzung zur Aufklärung der Struktur-Eigenschaftszusammenhänge. Neben der Polysaccharidfraktion (Monosaccharidzusammensetzung, glykosidische Bindungsverhältnisse, Fingerprinting nach enzymatischer Teilhydrolyse) und der Proteinfraktion (Gehalt, Aminosäurezusammensetzung) wurden die Anteile hydrophober Substituenten (*trans*-Ferulasäuregehalt, Methylierungs- und Acetylierungsgrad) sowie die Molekulargewichtsverteilung der Pektine analysiert.

3.2.1 MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG

Die Molekulargewichtsverteilung stellt einen wesentlichen Parameter zur Charakterisierung pflanzlicher Polymere dar. Insbesondere natürliche, komplexe Polymere wie Pektine weisen üblicherweise keine monomodale Verteilung auf, sondern liegen als Mischung unterschiedlicher

3 Material und Methoden

Größenfraktionen vor. Um die Verteilungen der Molekulargewichte verschiedener Polymere einfacher zu vergleichen, können Molekulargewichtsmittelwerte gebildet werden. Die verschiedenen Mittelwerte haben ihren Ursprung in den unterschiedlichen analytischen Verfahren, die zur Bestimmung eingesetzt werden. Das Gewichtsmittel (M_W) kann durch massensensitive Analyseverfahren wie Lichtstreuungsmessungen ermittelt werden und ist die meistverwendete Molekulargewichtsangabe. Das traditionell durch Osmometrie oder Endgruppenanalyse bestimmte Zahlenmittel (M_N) und das durch Diffusions- oder Sedimentationsanalysen bestimmbare z-statische Mittel (auch „Zentrifugenmittel“, M_Z) werden seltener für den direkten Molekulargewichtvergleich polydisperser Proben herangezogen, da bei diesen Mittelwerten definitionsgemäß hochmolekulare Fraktionen unterrepräsentiert (bei M_N) bzw. überrepräsentiert (bei M_Z) werden (Lansing und Kraemer 1935; Shit und Maiti 1986; Pfefferkorn 2004; Izunobi und Higginbotham 2011). M_N , M_W und M_Z ergeben sich aus der Häufigkeit n_i der Molmassen M_i nach (Gleichung 1):

$$M_\beta = \frac{\sum_i n_i M_i^{\beta+1}}{\sum_i n_i M_i^\beta} \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} M_N: \beta=0 \\ M_W: \beta=1 \\ M_Z: \beta=2 \end{array} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Die verschiedenen Molmassenmittelwerte weichen bei allen nicht-monomodalen Polymerlösungen insofern voneinander ab, dass stets gilt: $M_N < M_W < M_Z$. Die Differenz ist dabei von der Uneinheitlichkeit der in einer Lösung vorliegenden Molmassen („Polydispersität“) abhängig. Als Maß für die Uneinheitlichkeit der Molmassen bzw. die Breite der Verteilung kann der Polydispersitätsindex \mathcal{D} herangezogen werden, der sich aus dem Verhältnis von M_W zu M_N ergibt. Da in der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung des mittleren Molekulargewichts ein Mehrwinkellichtstreu (MALS)-Detektor und somit ein massensensitives Verfahren zur Verfügung stand, lag der Fokus auf der Bestimmung von M_W .

Die üblicherweise hohe Heterogenität der in einem extrahierten Pektin vorliegenden Molmassen empfiehlt deren Fraktionierung vor der Lichtstreuungsmessung. Gängigerweise erfolgt hierzu eine Trennung mittels Größenausschlusschromatographie (SEC). Alternativ kann die Auftrennung auch durch unterschiedliche Varianten der Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF) erfolgen. Im Vergleich zur SEC bietet die FFF bei hochmolekularen Polymeren leichte Vorteile in Bezug auf die Trennleistung und den Arbeitsbereich (Laudan 2004; Williams und Lee 2006; Ventouri *et al.* 2022). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Pektinlösungen mittels SEC aufgetrennt, da kein FFF-System zur Verfügung stand und die Trennkapazitäten der SEC für die Ermittlung und den Vergleich der Molekulargewichtsverteilung ausreichend sind. Die Trennung erfolgt bei der SEC meist auf Säulen mit polymerbasierter stationärer Phase, die durch hochporöse Oberflächen gekennzeichnet sind. Der Trennmechanismus basiert auf dem zur Verfügung stehenden Diffusionsvolumen, das vom hydrodynamischen Volumen der Polymere abhängig ist. Idealerweise wird die Trennung nicht durch die chemische Zusammensetzung des Analyten beeinflusst. Aufgrund des geringeren zur Verfügung stehenden Diffusionsvolumens eluieren

3.2 Strukturcharakterisierung der extrahierten Pektine

Moleküle mit einem hohen hydrodynamischen Volumen vor Analyten mit einem niedrigen hydrodynamischen Volumen.

Zur Probenvorbereitung wurden die zu analysierenden Pektine in 50 mM Natriumnitratlösung gelöst. Die Salzzugabe ist notwendig, um den ionischen Charakter der Pektine abzuschwächen und so eine Aggregation und damit eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Um mögliche unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurden die Pektinsuspensionen zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung eingesetzt. Nach Zentrifugation konnte bei den meisten Proben ein unlöslicher Rückstand festgestellt werden. Dies kann vermutlich auf die zur Extraktion abweichenden Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Salzzugabe) sowie die Ausbildung schwer löslicher Aggregate im Zuge des sich an die Extraktion anschließenden Trocknungsprozesses zurückgeführt werden (Wang *et al.* 2021). Aufgrund des mengenmäßig geringen Anteils ist jedoch davon auszugehen, dass die nicht miterfassten unlöslichen Fraktionen keinen bedeutenden Einfluss auf die ermittelten Molekulargewichtsverteilungen haben. Vermutlich könnte diese Fehlerquelle durch optimierte Trocknungsverfahren mit geringerer Temperatureinwirkung weiter verringert werden.

Die SEC-Analyse erfolgte mit isokratischer Elution und 50 mM Natriumnitratlösung als Elutionsmittel (Flussrate: 0,5 mL/min, Säulentemperatur: 50 °C). Zur chromatographischen Trennung der in dieser Arbeit untersuchten Pektine wurden unterschiedliche Säulen des Typs TSKgel PW_{XL} (G4000, G5000, G6000) der Firma Tosoh Bioscience (Tokio, Japan) eingesetzt. Die Säulen basieren auf hydroxylierten Polymethacrylaten und unterscheiden sich lediglich in der Porengrößenverteilung der Partikel. Neben dem Trennverhalten der einzelnen Säulen wurde auch die Trennleistung unterschiedlicher Säulenkombinationen getestet. Die zusätzlichen Trennsäulen bewirkten zwar eine leicht verbesserte Auftrennung der Pektinfraktionen; durch die stark verlängerten Mess- und Äquilibrierzeiten erwies sich diese Methode jedoch nicht als praktikabel zur Charakterisierung einer Vielzahl an Proben, insbesondere, da auch beim alleinigen Einsatz der Säulen G5000 bzw. G6000 eine zufriedenstellende Trennleistung erzielt werden konnte. Die Säule des Typs G4000 eignete sich nicht zur chromatographischen Trennung der labortechnisch extrahierten SBP, da aufgrund der zu geringen Porengrößen keine Auftrennung der Fraktionen mit hohem hydrodynamischem Volumen stattfand. Sofern nicht anderweitig beschrieben, wurden die M_w -Werte aller in dieser Arbeit diskutierten Pektine nach chromatographischer Trennung auf einer G6000-Säule (13 μ m, 300 x 7,8 mm) ermittelt.

Generell kann die Detektion der mittels SEC getrennten Polymere mithilfe unterschiedlicher Detektionsmethoden erfolgen, wobei üblicherweise Kombinationen aus Brechungsindex- (RI), UV- bzw. Diodenarray- (DAD), Viskositäts- und MALS-Detektoren eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden MALS-, RI- und DAD-Detektoren in Reihe geschaltet. Bei instrumentellen Aufbauten ohne MALS-Detektor wird M_w gängigerweise anhand einer externen Kalibrierung mit Polymeren definierter Molekulargewichte, wie Dextrane oder Pullulane, bestimmt. Aufgrund des zu Pektinen grundverschiedenen strukturellen Aufbaus ergibt sich ein unterschiedliches Verhältnis des hydrodynamischen Volumens zu M_w , sodass keine verlässlichen M_w für Pektine ermittelt

3 Material und Methoden

werden können. Diese Fehlerquelle kann durch den Einsatz eines MALS-Detektors vermieden werden, da M_w mittels MALS-Detektion absolut bestimmt werden können. Nichtsdestotrotz ist die RI-Detektion unerlässlich, da zur Berechnung der polymerspezifischen Parameter mittels MALS ein massenunspezifischer Konzentrationsdetektor erforderlich ist. Als universelle Detektionsmethode eignet sich RI-Detektion hierfür besser als beispielsweise UV bzw. DAD-Detektion, bei der die Kohlenhydratkomponenten der Pektine üblicherweise nicht erfasst werden können. In dieser Arbeit hatte die Analyse mittels DAD daher ausschließlich die Ermittlung der Verteilung von Ferulasäure (Detektion bei 323 nm) innerhalb der polydispersen Pektinproben zum Ziel (siehe Abschnitt 4.2.2.6).

Die Massenspezifität der MALS-Detektion kann anhand von Abbildung 3 veranschaulicht werden, worin die RI- und MALS-Chromatogramme einer SBP-Lösung dargestellt sind. Das MALS-Signal zeigt im vorderen Elutionsbereich (14 - 15 min) die stärkste Intensität, obwohl das RI-Signal nur mäßig intensiv ist. Dementsprechend sind in dieser Fraktion vergleichsweise wenige Moleküle, die jedoch neben einem hohen hydrodynamischen Volumen auch durch ein hohes Molekulargewicht gekennzeichnet sind. Während hochmolekulare Verbindungen mittels MALS-Detektion sensitiv erfasst werden, wird mit fortschreitendem Elutionsvolumen (17 - 22 min) veranschaulicht, dass Moleküle mit niedrigerer Molmasse nur bedingt erfasst werden. Trotz hoher RI-Signale und dementsprechend einer vergleichsweise hohen Zahl an Molekülen ist die Intensität des MALS-Signals gering. Aufgrund der Unsicherheit in der Erfassung niedermolekularer Fraktion können die mittels MALS-Detektion berechneten M_N -Werte in Abhängigkeit von der untersuchten Polymerlösung fehlerbehaftet sein, weshalb in dieser Arbeit lediglich die M_w -Werte angegeben werden.

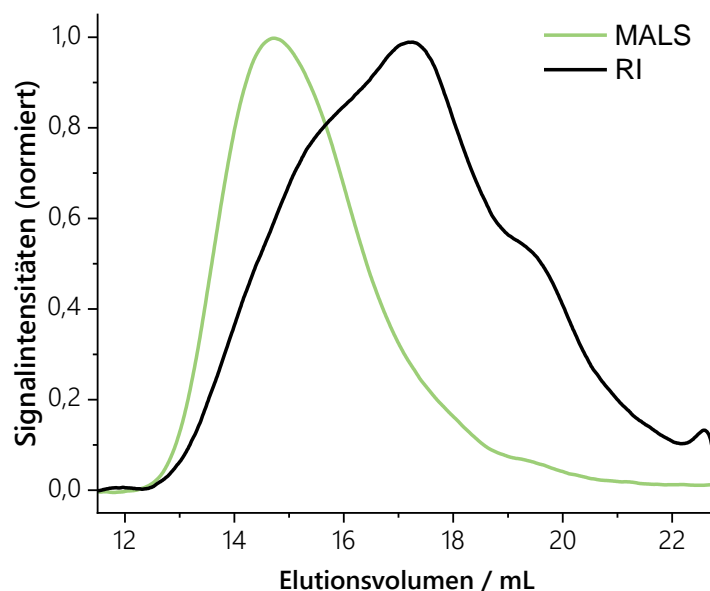


Abbildung 3: Chromatogramm einer Zuckerrübenpektinlösung nach Trennung mittels Größenausschlusschromatographie und Detektion mittels Mehrwinkellichtstreu- (MALS, grün) und Brechungsindexdetektion (RI, schwarz)). Die MALS- und RI-Signalintensitäten wurden normiert und geglättet

3.2 Strukturcharakterisierung der extrahierten Pektine

Die Bestimmung von M_w mittels MALS-Detektion erfolgt durch Messung der Intensität des gestreuten Lichts aus unterschiedlichen Winkeln und Extrapolation der Intensität I_θ bei einem Detektionswinkel θ von 0° . Der Zusammenhang zwischen I_θ und M_w kann mithilfe der erweiterten Lichtstreuungsgleichung aufgezeigt werden (Debye 1947; Zimm 1948; Wyatt 1993):

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P_\theta} + 2A_2c \quad \text{mit} \quad K = \frac{4\pi^2 (dn/dc)^2 n_{LM}^2}{N_A \lambda_0^4} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

$$R_\theta = \frac{(I_\theta - I_\theta^{LM}) r_{SD}^2}{I_0 V_s}$$

Die optische Konstante K setzt sich dabei aus dem Brechungsindexinkrement dn/dc , dem Brechungsindex des Lösungsmittels n_{LM} , der Avogadrozahl N_A und der Wellenlänge des verwendeten Lasers λ_0 zusammen. Während n_{LM} , N_A und λ_0 bekannt bzw. leicht ermittelbar und für Messreihen an einem Gerät üblicherweise konstant sind, ist dn/dc ein probenspezifischer Parameter. Für viele synthetische Polymere kann der Wert von dn/dc für verschiedene Lösungsmittel der Literatur entnommen werden. Bei komplexen Makromolekülen wie Pektinen sind hingegen nur begrenzt Literaturdaten vorhanden. Zudem muss beachtet werden, dass der dn/dc in Abhängigkeit von der strukturellen Zusammensetzung deutlich variieren kann. Für SBP werden in der Literatur beispielsweise dn/dc von 0,131 - 0,146 mL/g angegeben (Levigne *et al.* 2002a; Funami *et al.* 2007; Siew und Williams 2008; Fishman *et al.* 2013). Da dn/dc quadratisch in die Gleichung eingeht, wirken sich Abweichungen stark auf das ermittelte M_w aus. Dementsprechend empfiehlt es sich, dn/dc für unbekannte und strukturell diverse Proben vor der Bestimmung von M_w zu ermitteln.

In das Rayleigh-Verhältnis R_θ gehen neben der gemessenen Streulichtintensität I_θ und der Streuintensität des Lösungsmittels I_θ^{LM} auch die Intensität des Primärlichts I_0 , das Streuvolumen V_s und der Abstand zwischen Photodiode und Streuvolumen r_{SD} ein, sodass die ermittelten Werte geräteunabhängig verglichen werden können. Die Partikelstreuungsfunktion P_θ ist bei allen Polymeren mit einem Teilchendurchmesser von mindestens $\lambda/20$ zu berücksichtigen, da bei diesen Dimensionen von mehreren Streuzentren im Molekül und damit einer Winkelabhängigkeit von I_θ ausgegangen werden kann (Pfefferkorn 2004). Bei kleineren Polymeren kann P_θ hingegen vernachlässigt werden, da das Licht hier praktisch richtungsunabhängig gestreut wird. Der zweite Virialkoeffizient A_2 geht ebenfalls in die Gleichung ein und beschreibt die Wechselwirkungen zwischen den Polymeren im jeweiligen Lösungsmittel. Dementsprechend ist A_2 ein probenspezifischer Parameter, der ebenso wie dn/dc aus Literaturquellen oder Datenbanken entnommen oder vor der Messung bestimmt werden kann. Im Gegensatz zu dn/dc wirkt sich A_2 in der Praxis jedoch nur bedingt auf die berechneten M_w -Werte aus, da der Term $2 \cdot A_2 \cdot c$ meist vernachlässigbar gering ist (Wyatt 1993).

Da die in dieser Arbeit untersuchten Polymere Moleküldurchmesser von $> \lambda/20$ (635 nm/20 entspricht etwa 32 nm) aufweisen könnten, muss auch die angesprochene Partikelstreuungsfunktion P_θ berücksichtigt werden. Durch deren Einbringung in die allgemeine Lichtstreuungsgleichung (Gleichung 2) ergibt sich näherungsweise Gleichung 3:

3 Material und Methoden

$$\frac{Kc}{P_\theta} = \frac{1}{M_w} + \frac{1}{3M_w} \left(\frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \right)^2 \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) R_G^2 + 2A_2c \quad (\text{Gleichung 3})$$

Zur Auswertung dieser Gleichung wurde für die vorliegende Arbeit ein Zimm-Plot gewählt, bei dem $K \cdot c / R_\theta$ gegen $\sin^2(\theta/2)$ aufgetragen wird. Durch die Messung der Streulichtintensität aus mehreren Winkeln kann die Streulichtintensität bei einem Winkel von $\theta = 0^\circ$ extrapoliert werden. Der Ordinatenschnittpunkt der extrapolierten Geraden stellt den gesuchten Wert von $1/M_w$ dar. Aus der Steigung der extrapolierten Geraden kann zusätzlich der 2. Virialkoeffizient A_2 ermittelt werden. Der quadrierte Gyrationradius R_G^2 kann wiederum aus der Steigung der Extrapolationsgeraden der Streulichtintensität bei $c = 0$ bestimmt werden (Pfefferkorn 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswertung mithilfe der Software WinGPC (PSS polymer solutions, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde die Methode der „injizierten Masse“ genutzt, bei der die Konzentrationsberechnung der einzelnen Elutionsvolumina über die eingesetzte Probenkonzentration sowie das Injektionsvolumen erfolgt. Hierbei ist zu beachten, dass durch die bereits diskutierten unlöslichen Bestandteile, eventuell unterschiedliche Salzkonzentrationen sowie gegebenenfalls vorliegende Begleitstoffe (z.B. Nicht-Pektinpolysaccharide) eine leichte Ungenauigkeit in den berechneten Konzentrationen vorliegt. Dies wirkt sich wiederum auf die berechneten M_w -Werte aus. Für alle untersuchten Proben wurde zudem von einem dn/dc von 0,135 dL/g ausgegangen. Wie bereits diskutiert, stellt die Verwendung eines konstanten dn/dc eine starke Vereinfachung dar, da der dn/dc ein molekülspezifischer Parameter ist und demnach für exakte M_w -Bestimmungen für jede zu untersuchende Probe separat bestimmt werden müsste. Auf diese zeitintensive Prozedur wurde verzichtet, da bereits verschiedene, teils schwierig zu vermeidende Fehlerquellen und damit Unsicherheiten vorlagen. Zudem ist die Korrektheit des absoluten M_w für die Untersuchungen zu den Struktur-Eigenschaftszusammenhängen nachrangig, da ausschließlich ein Vergleich von Proben erfolgte, die unter identischen Bedingungen analysiert wurden. Die Arbeitsvorschrift zur M_w -Bestimmung mittels SEC-RI/MALS inklusive der chromatographischen Bedingungen ist in Abschnitt 8.2.1 zu finden.

3.2.2 CHARAKTERISIERUNG DER PROTEINFRAKTION

Ein erhöhter Proteingehalt wird häufig als einer der Gründe angeführt, der den guten Emulgiereigenschaften von SBP zugrunde liegt (Leroux *et al.* 2003; Williams *et al.* 2005; Siew und Williams 2008; Chen *et al.* 2016b; Liu *et al.* 2019; Schmidt *et al.* 2015b). Dementsprechend wichtig ist die Quantifizierung des Anteils an pektinassoziiertem Protein. Neben dem Proteingehalt könnte jedoch auch der strukturelle Aufbau der Proteinfraktion Bedeutung für die funktionellen Eigenschaften haben, weshalb auch die Aminosäurezusammensetzung ausgewählter Pektine untersucht wurde.

3.2.2.1 BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS

Zur Bestimmung des Proteingehalts pflanzlicher Ballaststoffpräparate werden die Verbrennungsmethode nach Dumas (1831) und die Aufschlussmethode nach Kjeldahl (1883) empfohlen (McCleary 2018; McCleary und McLoughlin 2022). Bei der Bestimmung des Proteingehalts von Pektinen wird neben den genannten Methoden teilweise auch die Färbemethode nach Bradford (1976) verwendet, obwohl die Quantifizierung pflanzlicher Zellwandproteine aufgrund der Kalibrierung mit einem standardisierten Protein wie bovinem Serumalbumin (BSA) stets fehlerbehaftet ist (Kpodo *et al.* 2017; Chen *et al.* 2016a; Abou-Elseoud *et al.* 2021). Allerdings haben auch der Kjeldahl-Aufschluss und die Methode nach Dumas neben verschiedenen Vorteilen auch Einschränkungen, die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden. Ein Vorteil beider Methoden ist, dass niedermolekulare stickstoffhaltige Begleitstoffe im Zuge der Aufreinigung abgetrennt werden. Anorganische Stickstoffquellen wie Nitrate oder Nitrite würden bei der Verbrennungsmethode nach Dumas allerdings ebenso wie Proteinstickstoff in Stickoxide überführt werden und dementsprechend zu einer Überbestimmung des Proteingehalts führen (Simonne *et al.* 1997; Simonne *et al.* 1998; Watson und Galliher 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteingehalt der Pektine nach Kjeldahlaufschluss bestimmt, da die Methode im Arbeitskreis etabliert ist und eine Erfassung des Proteingehalts mit hoher Präzision ermöglicht (Urbat *et al.* 2019). Der Aufschluss erfolgt dabei durch konzentrierte Schwefelsäure unter Zugabe eines Katalysatorgemisches. Bei dem verwendeten Wieninger-Katalysator wird durch Selen und Kupfersulfat der oxidative Aufschluss und die Umsetzung von organischem Stickstoff in Ammoniumsulfat katalysiert. Natriumsulfat bewirkt zudem eine Siedepunktserhöhung, sodass der Aufschluss bei höheren Temperaturen durchgeführt und damit die Analysendauer erheblich reduziert werden kann (McKenzie und Wallace 1954).

Zur Bestimmung des Stickstoffgehalts wird das gebildete Ammoniumsulfat durch Laugenbehandlung (üblicherweise Natronlauge) zu Ammoniak umgesetzt. Die Erfassung des freigesetzten Ammoniakstickstoffs erfolgt traditionell nach Wasserdampfdestillation in eine Borsäurelösung und einer anschließenden Titration der gebildeten Boratanionen gegen eine Salzsäurelösung (Jung *et al.* 2003). Alternativ kann der Ammoniak auch kolorimetrisch oder über eine Ammoniak-sensitive Elektrode bestimmt werden (McKenzie und Young 1975; Willis *et al.* 1996). Die verschiedenen Detektionsverfahren ermöglichen allesamt eine präzise Bestimmung des Stickstoffgehalts. Die Detektion über eine Ammoniak-sensitive Elektrode stellt jedoch eine weniger aufwändige und zeiteffizientere Analyse dar, weshalb dieser Ansatz zur Bestimmung des Stickstoffgehalts gewählt wurde (Urbat *et al.* 2019).

Aus dem ermittelten Stickstoffgehalt wird standardmäßig mit einem Umrechnungsfaktor von 6,25 auf den entsprechenden Proteingehalt der Probe umgerechnet. Die Anwendung dieses Faktors kann allerdings in einer Unter- bzw. Überbestimmung des Proteingehalts resultieren, da dieser Umrechnungsfaktor von einem Stickstoffgehalt der Proteinfraction von 16 % ausgeht. Der Stickstoffgehalt von Proteinen kann jedoch in Abhängigkeit von dessen Aminosäurezusammensetzung variieren. Dementsprechend müsste für einen korrekten

3 Material und Methoden

Umrechnungsfaktor jede zu untersuchende Probe hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung der Proteinfraction analysiert werden (Mariotti *et al.* 2008; Sriperm *et al.* 2011). Aufgrund des großen experimentellen Aufwands wird darauf in der Praxis jedoch meist verzichtet und der Fehler bei der Anwendung des universellen Umrechnungsfaktors von 6,25 in Kauf genommen. Für die vorliegende Arbeit wurde lediglich die Aminosäurezusammensetzung ausgewählter Pektine analysiert, weshalb der Umrechnungsfaktor von 6,25 für alle untersuchten Pektine herangezogen wurde. Die Arbeitsvorschrift zur Proteinbestimmung ist in Abschnitt 8.2.2.1 zu finden.

3.2.2.2 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG

Die Vielzahl und strukturelle Diversität der in pflanzlichen Proteinen vorkommenden Aminosäuren stellt eine analytische Herausforderung dar. Neben der komplexen chromatographischen Auftrennung ist auch eine vollständige Freisetzung der Aminosäuren schwer zu realisieren. Aufgrund der unterschiedlichen Stabilität und Reaktivität der verschiedenen Aminosäuren kann die Wahl ungeeigneter Hydrolysebedingungen zudem in einer teilweisen Diskriminierung bestimmter Aminosäuren wie Histidin, Serin oder Threonin resultieren, womit die Aussagekraft der ermittelten Aminosäurezusammensetzung geschmälert werden würde (Weiss *et al.* 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben zur Hydrolyse der pektinassoziierten Proteine mit 6 M Salzsäure versetzt und unter Sauerstoffausschluss für 20 h bei 120 °C inkubiert. Diese Hydrolysebedingungen werden oft verwendet und stellen einen Kompromiss zwischen möglichst vollständiger Freisetzung der Monomere aus dem Polymer bei gleichzeitig möglichst geringem Abbau der freigesetzten Monomere dar. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Carbonsäureamide Asparagin und Glutamin im Zuge der sauren Hydrolyse zum Großteil in Asparaginsäure und Glutaminsäure überführt werden und dementsprechend nicht separat quantifiziert werden können. Des Weiteren kommt es zur partiellen Zerstörung verschiedener Aminosäuren wie Tryptophan, Cystein und Methionin (Cuq und Cheftel 1983; Fountoulakis und Lahm 1998; Simat *et al.* 2003).

Die chromatographische Auftrennung der freigesetzten Aminosäuren kann mithilfe unterschiedlicher Systeme erfolgen. Während die Chromatographie Mitte des 20. Jahrhunderts meist auf Kationenaustauschmechanismen beruhte, etablierte sich mit der Zeit die Umkehrphasen (RP)-Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) als Methode der Wahl (Moore und Stein 1948; Moore *et al.* 1958; Hamilton 1963; Fekkes 1996). Diese Entwicklung ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass verschiedene Verfahren entwickelt wurden, bei denen die Aminosäuren prächromatographisch derivatisiert werden und die so eine Auftrennung auf RP-Säulen ermöglichen. Derivatisierungsmethoden wie die Fluorescamin-, Phenylthiocarbamyl- oder Ninhydrinderivatisierung, die teilweise auch zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt werden, haben jedoch unterschiedliche Limitierungen wie beispielsweise eine ungenügende Derivatstabilität, die Bildung mehrerer Derivate pro Aminosäure oder lediglich eine Umsetzung von primären Aminen (Samejima *et al.* 1971; Udenfriend *et al.* 1972; Bidlingmeyer *et al.* 1984). Die Umsetzung sekundärer Amine ist jedoch für

die Analyse von pektinassoziierten Proteinen unverzichtbar, da Prolin und Hydroxyprolin bedeutende Aminosäuren von AGP und verwandten Proteinen darstellen (Sommer-Knudsen *et al.* 1998). Cohen und Michaud (1993) entwickelten eine Methode, die auf der Umsetzung mit 6-Aminochinoly-*N*-hydroxysuccinimidylcarbammat (AQC) beruht und die genannten Limitierungen anderer Derivatisierungsreagenzien nicht aufweist. Dementsprechend findet die AQC-Derivatisierung weitverbreitete Anwendung und wurde auch in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung eingesetzt (Cohen und Deantonis 1994; Gwatidzo *et al.* 2013; Kambhampati *et al.* 2019). Als Nachteil der AQC-Derivatisierung ist jedoch zu nennen, dass unter den gegebenen Bedingungen kein stabiles Derivat von Tryptophan gebildet wird. Dementsprechend kann Tryptophan nicht verlässlich quantifiziert werden und wird nicht in die ermittelten Aminosäurezusammensetzungen mitaufgenommen. Da Tryptophan jedoch bereits im Zuge der sauren Hydrolyse teilweise degradiert wird, ist auch unabhängig von der gewählten Derivatisierungsmethode unter den gewählten Hydrolysebedingungen keine korrekte Quantifizierung möglich (Fountoulakis und Lahm 1998).

Die AQC-Derivate der Aminosäuren werden in der vorliegenden Arbeit nach Urvat *et al.* (2019) auf einer C18-Säule getrennt. Da sich Schwankungen im pH-Wert auf die Chromatographie auswirken können, werden zur Elution gepufferte Fließmittelsysteme verwendet. Die AQC-Derivatisierung ermöglicht, dass die derivatisierten Aminosäuren mittels Fluoreszenzdetektion (FLD) und damit hochempfindlich und selektiv detektiert werden können. Die Quantifizierung erfolgt über einen internen Standard (Norleucin). Die Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung mittels AQC-Derivatisierung ist in Abschnitt 8.2.2.2 zu finden.

3.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER POLYSACCHARIDFRAKTION

Pektinpolysaccharide können aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt aus einer Vielzahl an Monosacchariden zusammengesetzt sein, die zudem durch unterschiedliche glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sein können. Dementsprechend wichtig ist eine detaillierte strukturelle Charakterisierung dieser Fraktion.

3.2.3.1 MONOSACCHARIDZUSAMMENSETZUNG

Die Monosaccharidzusammensetzung ermöglicht erste Rückschlüsse auf vorliegende Polysaccharidstrukturen. Neben der Pektinzusammensetzung kann auch abgeschätzt werden, inwiefern durch das Extraktionsverfahren Nicht-Pektinpolysaccharide koextrahiert wurden. Die Ermittlung der Monosaccharidzusammensetzung eines Polysaccharids setzt die Spaltung der glykosidischen Bindungen zwischen den Monomeren voraus. Üblicherweise erfolgt eine saure Hydrolyse, wobei die Hydrolysebedingungen auf das zu untersuchende Material angepasst werden müssen. Für Proben mit einem hohen Gehalt unlöslicher Ballaststoffe wird meist eine Schwefelsäurehydrolyse durchgeführt, die auch die Erfassung kristalliner Cellulose ermöglicht (Saeman 1945). Allerdings werden mit dieser Methode Polyuronsäuren aufgrund der stabilen

3 Material und Methoden

glykosidischen Bindungen nicht vollständig aufgeschlossen, was in einer Unterbestimmung des Galacturonsäureanteils resultiert. Zudem wird auch der Anteil an Desoxyzuckern wie Rhamnose tendenziell unterbestimmt, weshalb die Schwefelsäurehydrolyse für Pektine ungeeignet ist (De Ruiter *et al.* 1992; Willfor *et al.* 2009). Für lösliche Ballaststoffproben bzw. für Proben mit einem hohen Pektingehalt ist eine Methanolyse besser geeignet, bei der die Behandlung mit methanolischer Salzsäure und anschließender Spaltung der gebildeten Methylglykoside mittels Trifluoressigsäure (TFA) eine zuverlässige Erfassung polyuronsäurehaltiger Materialien ermöglicht (De Ruiter *et al.* 1992; Willfor *et al.* 2009). Beachtet werden muss jedoch, dass schwer- bzw. unlösliche Polysaccharide mittels Methanolyse nur unzureichend erfasst werden. Diese Einschränkung ist für die vorliegende Arbeit jedoch unerheblich, da ausschließlich durch wässrige Extraktion gewonnene Proben untersucht wurden. Dementsprechend erfolgte die Hydrolyse der glykosidischen Bindungen zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung für alle Proben mittels Methanolyse und anschließender TFA-Hydrolyse.

Die Analyse der freigesetzten Monosaccharide erfolgte mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD). Vorteile dieser Methode im Vergleich zur gaschromatographischen (GC) Analyse sind, dass auf einen zeitaufwändigen Derivatisierungsschritt sowie eine vorherige Reduktion der Uronsäuren verzichtet werden kann (De Ruiter *et al.* 1992; Pettolino *et al.* 2012). Zudem können Neutralzucker und Uronsäuren in einem Lauf aufgetrennt und sowohl sensitiv als auch selektiv detektiert werden. Die Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung inklusive der chromatographischen Bedingungen ist in Abschnitt 8.2.3.1 zu finden.

3.2.3.2 ANALYSE DER GLYKOSIDISCHEN BINDUNGEN

Die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung liefert zwar Hinweise auf die vorliegenden Polysaccharide, nicht jedoch auf die Anteile der unterschiedlichen glykosidischen Bindungstypen. Diese Informationen sind jedoch essentiell, um die Feinstruktur von Polysacchariden detailliert zu beschreiben. Die glykosidischen Bindungsverhältnisse werden standardmäßig durch eine Methylierungsanalyse bestimmt, deren Prinzip in Abbildung 4 dargestellt ist.

In dieser Arbeit wurde die Methylierungsanalyse nach Wefers und Bunzel (2015) durchgeführt, die eine leicht modifizierte Version der Methode von Gniechwitz *et al.* (2007) darstellt und die wiederum auf der Methode von Nunes und Coimbra (2001) beruht. Im ersten Schritt erfolgt die Methylierung der freien Hydroxygruppen. Dazu werden die in Dimethylsulfoxid gequollen bzw. gelösten Proben nach Ciucanu und Kerek (1984) unter Zugabe von frisch gemörsertem Natriumhydroxid mit Methyljodid behandelt. Gegenüber der Methylsulfinyl-Carbanion Methode (Hakomori 1964) bietet die Natriumhydroxid Methode unter anderem die Vorteile einer einfacheren und sicheren Handhabung, einer verringerten Anzahl an unerwünschten Nebenprodukten sowie einer erhöhten Ausbeute an permethylierten Verbindungen (Pettolino *et al.* 2012). Um das Risiko einer unvollständigen Methylierung und damit von Fehlinterpretationen

3.2 Strukturcharakterisierung der extrahierten Pektine

zu verringern, wurde der Methylierungsschritt bei den in dieser Arbeit analysierten Proben zweifach durchgeführt.

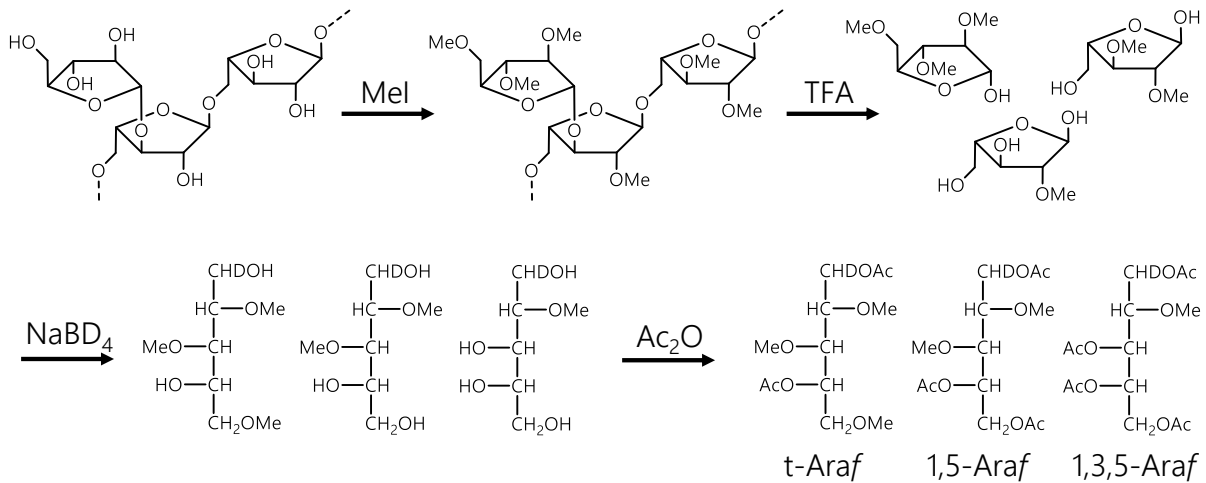


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Methylierungsanalyse am Beispiel eines Teilstücks einer Arabinanseitenkette. Die Methylierung erfolgt mit Methyljodid (MeI), die Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA), die Reduktion mit Natriumbordeuterid (NaBD_4) und die Acetylierung mit Acetanhydrid (Ac_2O). t: terminal, Ara: Arabinose, f: Furanose

Die permethylierten Polysaccharide werden mit 2 M TFA behandelt, um eine Hydrolyse der glykosidischen Bindungen zu erzielen. TFA wird verwendet, da sie mittels Evaporation einfach zu entfernen ist. Anschließend werden die freigesetzten permethylierten Monosaccharide mittels Natriumbordeuterid reduziert, was sowohl in einer Ringöffnung als auch einer Deuteriummarkierung des anomeren Kohlenstoffs resultiert. Im Zuge der Hydrolyse der glykosidischen Bindungen gehen zwar die Informationen über die anomere Konfiguration verloren, allerdings ermöglicht die Deuteriummarkierung die massenspektrometrische (MS) Unterscheidung von Monosaccharidderivaten, die chromatographisch nicht aufgetrennt werden. So können beispielsweise trotz Koelution die Anteile an 1,2- und 1,4-substituierten Xylopyranosen durch die Verhältnisse der jeweiligen charakteristischen Massefragmente (m/z 117 zu m/z 118, siehe Abbildung 5) näherungsweise bestimmt werden (Björndal *et al.* 1970; Nguema-Ona *et al.* 2012).

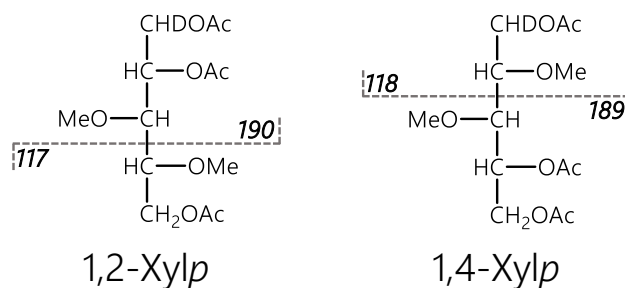


Abbildung 5: Primärfragmente der permethylierten Alditolacetate (PMAA) von 1,2-Xylp und 1,4-Xylp. Durch die Deuteriummarkierung ergeben sich um 1 m/z verschobene Fragmente, die eine massenspektrometrische Unterscheidung der koeludierenden PMAA ermöglichen. Ac: Acetylrest, Me: Methylrest, p: Pyranose, Xyl: Xylose

3 Material und Methoden

Abschließend werden die zuvor an den glykosidischen Bindungen beteiligten Hydroxygruppen, katalysiert durch 1-Methylimidazol, mit Acetanhydrid acetyliert (Blakeney *et al.* 1983). Die Acetylierung der freien Hydroxygruppen stellt durch die Erhöhung der Flüchtigkeit die Grundlage für eine Analyse mittels GC dar. Zudem ermöglicht das in Abhängigkeit von den im Polysaccharid vorliegenden Verknüpfungstypen unterschiedliche Methylierungs- und Acetylierungsmuster eine Unterscheidung verschiedener permethylierter Alditolacetate (PMAA) mithilfe von MS. Dies ist möglich, da PMAA bevorzugt zwischen methoxylierten bzw. zwischen methoxylierten und acetoxylierten Kohlenstoffen gespalten werden und sich so charakteristische Fragmentierungsmuster ergeben (Bjørndal *et al.* 1967). Über den Vergleich mit Literaturdaten und öffentlich zugänglichen Datenbanken wie der des *Complex Carbohydrate Research Center* (CCRC) können die PMAA zugeordnet werden, da die entsprechenden Spektren standardmäßig nach Elektronenstoßionisation bei einem Ionisationspotential von 70 eV aufgenommen wurden (Sasaki *et al.* 2005; Sims *et al.* 2018).

Die Bestimmung der molaren Anteile der PMAA erfolgt durch eine GC-Analyse mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID) unter identischen chromatographischen Bedingungen wie bei der GC-MS Analyse. Die Detektion mittels FID hat den Vorteil, dass das Signal über einen weiten Bereich linear proportional zum Kohlenstoffgehalt des Analyten ist und so, unter Einbeziehung der von Sweet *et al.* (1975) ermittelten Korrekturfaktoren, die Verhältnisse der mittels GC-MS zugeordneten PMAA bestimmt werden können. Die im Zuge der Methylierungsanalyse genutzten GC-Bedingungen sind zusammen mit der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Abschnitt 8.2.3.2 zu finden.

3.2.3.3 ENZYMATISCHES ARABINANPROFILING

Über eine Analyse der glykosidischen Bindungsverhältnisse mittels Methylierungsanalyse können bereits viele Informationen über die strukturelle Zusammensetzung des Polymers gewonnen werden. Im Zuge der Derivatisierung zu PMAA gehen jedoch auch einige Strukturinformationen verloren. Neben der Konfiguration des anomeren Kohlenstoffs können beispielsweise auch keine Aussagen über die Verteilung unterschiedlich substituierter Monomereinheiten im Polysaccharid getroffen werden. Dementsprechend ist die Anwendung weiterer analytischer Methoden notwendig, um die Struktur komplexer Polysaccharide umfassend beschreiben zu können.

Bei SBP ist insbesondere eine nähere Charakterisierung der Arabinanfraktion relevant, da SBP in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode durch hohe Anteile an komplexen Arabinanseitenketten gekennzeichnet sind (Guillon und Thibault 1989; Oosterveld *et al.* 2000a). Daher wurde das von Wefers und Bunzel (2016a) entwickelte Arabinanprofiling durchgeführt, bei dem durch den Einsatz von *endo*- α -1,5-L-Arabinanase charakteristische Oligosaccharide aus dem Arabinanrückgrat freigesetzt werden. Die freigesetzten Arabinan oligosaccharide können mittels HPAEC-PAD(/MS) anhand charakteristischer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert werden. Über relative Responsefaktoren gegenüber dem internen Standard (Raffinose) können

die Anteile der Oligosaccharide semiquantitativ erfasst werden. Die mittels Methylierungsanalyse gewonnenen Strukturinformationen können durch die Analyse der Zusammensetzung der enzymatisch freigesetzten Seitenkettenfragmente ergänzt werden, da unter anderem unmittelbare Rückschlüsse über die Verteilung der Substitutionen des Arabinanrückgrats (regelmäßig bzw. blockweise) gewonnen werden. Bei der Interpretation muss jedoch bedacht werden, dass die Arabinan oligosaccharide vermutlich nicht quantitativ freigesetzt werden, da die enzymatische Zugänglichkeit bei komplexen Strukturabschnitten begrenzt sein könnte. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Methode aufgrund chromatographischer Limitierungen lediglich Oligosaccharide bis zu einem Polymerisationsgrad (*degree of polymerization*, DP) von 7 miteinschließt. Dementsprechend kann insbesondere bei hochverzweigten Arabinanfraktionen die strukturelle Komplexität der Arabinane unterschätzt werden, falls höhermolekulare Oligosaccharide diskriminiert werden. Die chromatographischen Bedingungen sowie die allgemeine Arbeitsvorschrift sind in Abschnitt 8.2.3.3 zu finden.

3.2.4 ANALYSE HYDROPHOBER SUBSTITUENTEN

Die Hydrophobizität der Pektinstruktur wird nicht nur durch den Anteil und die Zusammensetzung der Proteinfraction, sondern auch durch verschiedene Substituenten beeinflusst. Die quantitative Erfassung dieser Komponenten ist insbesondere im Kontext der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der Struktur und den Emulgierereigenschaften wichtig, da die Hydrophobizität großen Einfluss auf die Oberflächenaktivität und damit die Emulgierereigenschaften von SBP haben kann (Bindereif *et al.* 2022). Die quantitativ bedeutendsten Modifikationen sind die Ferulasäuresubstitution der Arabinane und Galactane sowie die Methylierung und Acetylierung des Galacturonanrückgrats.

3.2.4.1 BESTIMMUNG DES TRANS-FERULASÄUREGEGHALTS

Die Bestimmung des Gehalts an pektinassoziierten phenolischen Säuren wie Ferulasäure setzt deren Freisetzung voraus. Da Ferulasäure estergebunden an Arabinanen und Galactanen vorliegt, kann hierzu eine Behandlung mit Alkalilauge durchgeführt werden (Parker *et al.* 2005). Die Analyse der freigesetzten Ferulasäure kann sowohl mittels GC als auch über HPLC-basierte Verfahren erfolgen (Sen *et al.* 1991; Packert und Steinhart 1995; Renger und Steinhart 2000; Bunzel *et al.* 2001). Allerdings setzt die GC-Analyse eine Derivatisierung voraus, was bei der hohen Anzahl an zu untersuchenden Proben einen erheblichen Mehraufwand darstellen würde. Dieser Schritt entfällt bei der Analyse mittels HPLC, weshalb die Methode von Dobberstein und Bunzel (2010) zur Bestimmung des Ferulasäuregehalts der Pektine eingesetzt wurde. Diese Methode ermöglicht die Bestimmung monomerer und oligomerer Hydroxymethylsäuren. Für die vorliegende Arbeit wurde jedoch ausschließlich der Gehalt an monomerer *trans*-Ferulasäure bestimmt, da die Anteile anderer Hydroxymethylsäuren sowie oligomerer Ferulasäuren erheblich niedriger sind.

3 Material und Methoden

Die Verseifung erfolgt hierbei durch 18-stündige Behandlung mit 2 M Natronlauge unter Licht- und Sauerstoffausschluss, da so das Risiko einer photoinduzierten *trans-cis*-Isomerisierung sowie eines oxidativen Abbaus der Propenylseitenkette von Ferulasäure verringert werden kann (Kahnt 1967; Bunzel *et al.* 2005a). Um die freigesetzten Verbindungen vom restlichen Material abzutrennen, erfolgt eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether. Diese setzt eine Ansäuerung des Extraktionsansatzes voraus, da die phenolischen Säuren nur in protonierter Form in die Etherphase überführt werden können. Vor der Extraktion wird *ortho*-Cumarsäure als interner Standard zugesetzt, um Verfälschungen der ermittelten Gehalte durch das Extraktionsverfahren auszugleichen. Nach Evaporation des Diethylethers können die Analyten in einem Methanol-Wassergemisch (50/50, v/v) aufgenommen und auf einer Phenyl-Hexyl-Säule aufgetrennt werden. Die Detektion von *trans*-Ferulasäure und *ortho*-Cumarsäure erfolgt über die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 323 nm, die Detektion von *cis*-Ferulasäure bei 308 nm. Die Zuordnung der Analyten erfolgt über die Retentionszeiten und wird über das Abgleichen der UV/Vis-Spektren abgesichert. Die zur Bestimmung des Ferulasäuregehalts eingesetzten chromatographischen Bedingungen sind zusammen mit der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Abschnitt 8.2.4.1 zu finden.

3.2.4.2 BESTIMMUNG DES METHYLIERUNGS- UND ACETYLIERUNGSGRADS

Um den Veresterungsgrad des Galacturonanrückgrats bestimmen zu können, müssen die Gehalte an estergebundenem Methanol und Essigsäure sowie der Galacturonsäuregehalt ermittelt werden. Im industriellen Kontext werden diese Parameter häufig titrimetrisch bestimmt, da die Methode schnell und mit einem vergleichsweise geringen Aufwand verbunden ist und sich dementsprechend gut für Routineuntersuchungen eignet. Allerdings werden für die titrimetrische Analyse große Probenmengen benötigt, weshalb für die labortechnische Bestimmung des Methylierungsgrads und des Acetylierungsgrads andere Methoden angewandt werden müssen. Infrarotspektroskopische Methoden ermöglichen zwar ebenfalls eine unaufwändige Bestimmung des Methylierungsgrads, sind jedoch unter anderem aufgrund der geringen Auflösung auch eher für routinemäßige Analysen im Rahmen der Qualitätssicherung geeignet (Chatjigakis *et al.* 1998; Kyomugasho *et al.* 2015). Um auch geringe Methylierungs- und Acetylierungsgrade bei unterschiedlichen Proben genau bestimmen zu können, erfolgt daher meist eine zweigeteilte Analyse, bei der der Galacturonsäuregehalt getrennt vom Gehalt an Methanol und Essigsäure ermittelt wird.

Uronsäuregehalt. Die Ermittlung des Methylierungs- und Acetylierungsgrads des Galacturonanrückgrats setzt die Kenntnis des absoluten Galacturonsäuregehalts voraus. Die im Zuge der Monosaccharidanalyse ermittelten relativen Galacturonsäureanteile können zwar auf absolute Gehalte hochgerechnet werden, allerdings kann es hierbei methodisch bedingt zu einer Unterbestimmung des Galacturonsäuregehalts kommen. Daher wird der absolute Uronsäuregehalt üblicherweise photometrisch nach saurer Hydrolyse und Umsetzung mit einem Farbreagenz bestimmt. Die Wahl des Farbreagenz hat dabei erheblichen Einfluss auf die Spezifität

und die Empfindlichkeit der Reaktion. Die ersten veröffentlichten Methoden wurden mit Carbazol als Farbreagenz durchgeführt (Dische 1947; Bitter und Muir 1962; Galambos 1967). Hierbei werden jedoch auch Hexosen und in geringerem Ausmaß auch Pentosen zu farbigen Komplexen umgesetzt, sodass der Uronsäuregehalt bei diesen Methoden in Abhängigkeit vom untersuchten Material überbestimmt wird. Daher beruhen die meisten heutzutage verwendeten Verfahren auf der von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) entwickelten Umsetzung mit *m*-Hydroxydiphenyl (Filisetti-Cozzi und Carpita 1991; van den Hoogen *et al.* 1998). Neben der deutlich erhöhten Spezifität ermöglicht die *m*-Hydroxydiphenyl-Färbung auch eine empfindlichere Detektion von Uronsäuren sowie eine kürzere Analysendauer (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973).

Allgemein ist der vereinfachte Reaktionsablauf bzw. der geringere analytische Zeitaufwand ein großer Vorteil photometrischer Methoden. Dem gegenüber steht jedoch die im Vergleich zu chromatographischen Methoden geringere Selektivität. So kann bei der Analyse unter anderem nicht zwischen Galacturonsäure und Glucuronsäure unterschieden werden. Auch wenn Glucuronsäure bei den in dieser Arbeit untersuchten Pektinen nur eine Minorkomponente darstellt, wird der Galacturonsäuregehalt durch deren Miterfassung stets überbestimmt. Zusätzlich trägt die bereits diskutierte Farbgebung anderer Monosaccharide wie Arabinose oder Galactose zur Überbestimmung des Galacturonsäuregehalts bei (Blumenkrantz und Asboe-Hansen 1973; Kintner und van Buren 1982). Darüber hinaus kann auch die Kalibrierung mit monomerer Galacturonsäure zur Überbestimmung beitragen, da diese bei der Umsetzung mit *m*-Hydroxydiphenyl eine geringere Farbentwicklung aufweist als Galacturonsäureoligomere bzw. -polymere (Matsushashi und Hatanaka 1992). Galacturonsäureoligomere könnten in den zu untersuchenden Pektinproben vorliegen, falls die glykosidischen Bindungen im Zuge der Hydrolyse nicht vollständig gespalten werden.

Trotz der diskutierten Limitierungen photometrischer Verfahren wird in dieser Arbeit eine adaptierte Version der Methode nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) zur Bestimmung des Galacturonsäuregehalts der Pektinproben eingesetzt. Zum einen, da keine überlegenen Alternativmethoden zur Verfügung stehen. Zum anderen, da sich diese Methode als Standardverfahren zur Uronsäurebestimmung von Pektinen etabliert hat und die erhaltenen Werte demnach einen Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien zulassen. Vor der eigentlichen Farbreaktion wurden die Proben mit 12 M Schwefelsäure vorhydrolysiert, um einen verbesserten Aufschluss zu erzielen. Nichtsdestotrotz ist es wahrscheinlich, dass nicht alle Polygalacturonsäuren aufgeschlossen werden, sodass eine Verfälschung der Ergebnisse durch nicht hydrolysierte Galacturonsäureoligomere verringert, aber nicht vermieden werden kann (Matsushashi und Hatanaka 1992). Nach Filtration und Verdünnung wurden die Proben mit schwefelsaurem Natriumtetraborat umgesetzt (95 °C; 5 min) und anschließend die Farbreaktion durch die Zugabe alkalischer *m*-Hydroxydiphenyl-Lösung gestartet. Nach 20 min wurde die Absorption der Proben sowie der entsprechenden Blindproben bei 520 nm gemessen. Die Blindproben wurden nicht mit dem Farbreagenz umgesetzt und für alle untersuchten Pektinproben mitgeführt, um eine Beeinflussung der ermittelten Uronsäuregehalte durch die

3 Material und Methoden

verwendeten Reagenzien oder durch eine mögliche Umsetzung neutraler Monosaccharide in farbige Verbindungen im Zuge der Schwefelsäure/Tetraborat-Behandlung zu verhindern. Allerdings muss beachtet werden, dass bei dieser Korrektur die mögliche Umsetzung von Intermediärprodukten, die im Zuge der Behandlung mit Schwefelsäure/Tetraborat und *m*-Hydroxydiphenyl aus den neutralen Monosacchariden gebildet werden können, nicht miterfasst werden (Kintner und van Buren 1982). Die Arbeitsvorschrift zur photometrischen Uronsäurebestimmung ist in Abschnitt 8.2.4.2 zu finden.

METHANOL- UND ESSIGSÄUREGEHALT. Zur Bestimmung des Gehalts an estergebundenem Methanol und Essigsäure erfolgt üblicherweise zunächst eine Verseifung mit Natronlauge, um Methanol und Essigsäure freizusetzen. Nach etwaigen Aufarbeitungsschritten können die Analyten mittels HPLC, GC oder Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie erfasst werden. Bei den HPLC Methoden ist jedoch die Störanfälligkeit durch koeluierende Matrixbestandteile sowie die geringe RI-Signalempfindlichkeit von Methanol zu beachten (Voragen *et al.* 1986; Levigne *et al.* 2002b). Bei den GC-Methoden kann zwar die Empfindlichkeit durch eine vorgeschaltete Festphasenmikroextraktion (SPME) deutlich verbessert werden, jedoch kann die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stark durch das Probenmaterial (z.B. hohe Salzkonzentration, Störsubstanzen) und Abweichungen bei den SPME-Bedingungen beeinflusst werden (Mester *et al.* 2001; Savary und Nuñez 2003; Nunes *et al.* 2006). Ein großer Vorteil NMR-basierter Verfahren ist, dass im Gegensatz zu den chromatographischen Methoden keine Kalibrierung mit Standardsubstanzen notwendig ist (Rizzo und Pinciroli 2005). Zudem können Methylierungs- und Acetylierungsgrade mittels ¹H-NMR-Spektroskopie vergleichsweise schnell bestimmt werden. Bédouet *et al.* (2003) entwickelten eine Methode, bei der Methylierungs- und Acetylierungsgrade direkt nach Verseifung im NMR-Röhrchen bestimmt werden kann. Allerdings wird die Genauigkeit der Bestimmungen durch die komplexen Spektren mit teilweise überlappenden Signalen beeinträchtigt. Die geringe spektrale Auflösung hängt auch damit zusammen, dass die Messungen bei 80 °C durchgeführt werden, was sich negativ auf die Signalbreite und -form auswirkt. Zusätzlich resultiert die hohe Temperatur in einer partiellen Evaporation von Methanol und dementsprechend in einer weiteren Beeinträchtigung der Messergebnisse (Bédouet *et al.* 2003). Neumüller *et al.* (2013) konnten zeigen, dass die Gehalte an aus verschiedenen Ballaststoffproben freigesetzter Essigsäure auch ohne erhöhte Temperaturen (27 °C) bei kurzen Aufnahmezeiten empfindlich erfasst werden können.

Müller-Maatsch *et al.* (2014) entwickelten darauf aufbauend eine Methode, bei der neben Essigsäure auch Methanol und Ferulasäure mittels ¹H-NMR-Spektroskopie quantitativ bestimmt werden können. Die Methode beruht darauf, dass die Proben nach Verseifung zentrifugiert und filtriert werden, sodass eine Abtrennung der freigesetzten Analyten von einem Großteil der Matrixkomponenten erfolgt und gut aufgelöste Spektren aufgenommen werden können. Die hochfeldverschobenen Protonensignale der Methylgruppen von Methanol und Essigsäure liegen dadurch fast vollständig isoliert vor. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe von 3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3-*d*₄-säure (TMSP-*d*₄), das vor der Verseifung als interner Standard zugegeben wird. Aufgrund der simplen Probenaufarbeitung, Robustheit und Genauigkeit wurde

die Methode von Müller-Maatsch *et al.* (2014) mit den von Becker (2020) beschriebenen Modifikationen in dieser Arbeit zur Bestimmung des Gehalts an estergebundenem Methanol und Essigsäure eingesetzt. Der *trans*-Ferulasäuregehalt wurde nicht mit dieser Methode ermittelt, da die unter den gewählten Analysebedingungen geringen Signalintensitäten teilweise keine zweifelsfreie Bestimmung ermöglichten. Zur Bestimmung der Methylierungs- und Acetylierungsgrade wurden die ermittelten Methanol- und Essigsäuregehalte der Pektinproben auf die spektralphotometrisch bestimmten Galacturonsäuregehalte bezogen. Die zur Bestimmung des Gehalts an estergebundenem Methanol und Essigsäure verwendeten NMR-spektroskopischen Bedingungen sind zusammen mit der Arbeitsvorschrift in Abschnitt 8.2.4.2 zu finden.

3.3 GEZIELTE MODIFIKATION DER PEKTINSTRUKTUR

Die gezielte Modifikation bestimmter Struktur motive der Pektine ermöglicht Rückschlüsse auf die Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften durch die entsprechenden Strukturen. Die Pektinstruktur kann durch physikalische (z.B. Temperatur, Druck), chemische (z.B. Säure-, Laugenbehandlung) oder enzymatische Methoden modifiziert werden. Physikalische und chemische Ansätze haben den Vorteil, dass sie meist mit einem geringen Zeitaufwand verbunden und einfach zu realisieren sind. Allerdings handelt es sich um unspezifische Methoden, sodass üblicherweise verschiedene Strukturelemente parallel modifiziert werden und dementsprechend Eigenschaftsänderungen nicht auf einzelne Strukturveränderungen zurückgeführt werden können.

Die Strukturmodifikation mittels spezifischer Enzyme ist daher die Methode der Wahl, um die Struktur-Eigenschaftszusammenhänge von Polysacchariden nähergehend zu untersuchen. Eine Herausforderung ist jedoch die begrenzte kommerzielle Verfügbarkeit von spezifischen Enzymen zur Modifikation von Pektinen. Erhältliche Enzympräparate weisen gegebenenfalls Substratspezifitäten für andere Polysaccharide auf, sodass verminderte Aktivitäten bei SBP bestehen können. Des Weiteren kann die enzymatische Aktivität durch eine der komplexen Struktur von SBP geschuldeten schlechtere Zugänglichkeit bzw. durch das Vorliegen bestimmter Strukturelemente gemindert werden. Beispielsweise kann die Aktivität von Pektinmethylesterasen durch acetylierte Galacturonsäureeinheiten gehemmt werden (Pippen *et al.* 1950; Oosterveld *et al.* 2000b). Zudem ist zu beachten, dass auch bei Enzymen mit hoher Spezifität in geringem Umfang unerwünschte Nebenaktivitäten auftreten könnten. Um das Ausmaß der Modifikation und das Auftreten unerwünschter Strukturveränderungen festzustellen, ist daher eine detaillierte Strukturcharakterisierung der Pektine vor und nach Modifizierung unerlässlich.

Meist wird bei der Ermittlung von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen untersucht, inwiefern sich partielle Abspaltungen bestimmter Strukturelemente auf die Eigenschaften auswirken (Chen *et al.* 2016a; Zhou *et al.* 2021; Funami *et al.* 2011). Es wäre jedoch auch möglich, die Auswirkungen einer Addition bestimmter Strukturelemente zu einer bestehenden Pektinstruktur zu

3 Material und Methoden

charakterisieren. Beispielsweise kann der Methylierungsgrad durch die Behandlung mit angesäuertem Methanol erhöht werden (Heri *et al.* 1961a, 1961b). Allerdings ist die gezielte Addition von Verbindungen zu einer bestehenden Polymerstruktur meist deutlich aufwändiger als deren Eliminierung (Renard und Jarvis 1999; Rosenbohm *et al.* 2003). Zusätzlich besteht bei dementsprechend umfangreicheren Reaktionsschemata ein erhöhtes Risiko für unerwünschte Strukturmodifikationen. Komplexere Fragestellungen, wie beispielsweise das Hinzufügen oder Verlängern von AG-Strukturen zu einem bestehenden Pektinpolymer, sind zudem praktisch nur schwer realisierbar. Daher wurden für die vorliegende Arbeit nicht die Auswirkungen von Additions- bzw. Substitutionsreaktionen untersucht, sondern ausschließlich von partiellen Abspaltungen bestimmter Strukturelemente. Die Analyse der Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften durch Abspaltungen ist auch insofern relevanter, als dass Strukturveränderungen untersucht werden, die auch durch die Anwendung unterschiedlicher Extraktionsbedingungen hervorgerufen werden können.

Als Substrat wurde für alle durchgeführten Modifikationsansätze ein SBP ausgewählt, welches durch vergleichsweise milde Säureextraktion (pH 2; 80 °C; 1 h) gewonnen wurde. Für die in Abschnitt 3.3.2 beschriebene enzymatische Modifikation verschiedener Strukturelemente wurde eine andere Charge eines auf diese Weise extrahierten SBP verwendet als für die Modifikation des Veresterungsgrads (Abschnitt 3.3.1), der Arabinanfraktion (Abschnitt 3.3.3) und der Galacturonanfraktion (Abschnitt 3.3.4).

3.3.1 MODIFIKATION DES VERESTERUNGSGRADS DURCH ALKALIBEHANDLUNG

Ein Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung des Einflusses estergebundener Substituenten auf die Emulgiereigenschaften von SBP. Zur Freisetzung von Methanol, Essigsäure und Ferulasäure werden in der Literatur sowohl chemische Ansätze (Säure- bzw. Alkalibehandlung) als auch enzymatische Methoden beschrieben, bei denen die Freisetzung durch unterschiedliche Methyl-, Acetyl- bzw. Ferulasäureesterasen erfolgt (Kirtchev *et al.* 1989; El-Nawawi und Heikal 1995; Renard und Thibault 1996; De Vries *et al.* 2002; Kim *et al.* 2008; Gou *et al.* 2012; Müller-Maatsch *et al.* 2014). Die Behandlung mit Lauge oder Säure führt dabei zu einer ungerichteten Entesterung, während enzymatische Ansätze in Abhängigkeit von der Herkunft des Enzyms (pflanzlich oder fungal) beispielsweise auch zu blockweise entesterten Galacturonanabschnitten führen können (Hunter und Wicker 2005; Willats *et al.* 2006).

Für die vorliegende Arbeit erfolgte die Freisetzung der estergebundenen Substituenten nicht enzymatisch, da keine Pektinmethylesterasen bzw. -acetylerasen mit der entsprechenden Substratspezifität zur Verfügung standen. Daher wurde ein chemischer Ansatz gewählt, bei dem die Substituenten durch Laugenbehandlung freigesetzt werden sollten. Eine alkalische Freisetzung ist dabei besser geeignet, da die für eine säurekatalysierte Entesterung benötigte Säurekonzentration zwangsläufig auch in der Spaltung glykosidischer Bindungen und damit einer Modifikation der Polysaccharidfraktion resultieren würde. Allerdings hat die alkalische

Entesterung auch verschiedene Nachteile. Zum einen wird die Ergründung von Struktur-Eigenschaftszusammenhängen dadurch erschwert, dass die Freisetzung nicht spezifisch ist und es so zur gleichzeitigen Freisetzung von Methanol, Essigsäure und Ferulasäure kommen kann. Zum anderen könnte die Laugenbehandlung, in Abhängigkeit von den gewählten Reaktionsbedingungen, neben der Freisetzung der Substituenten auch in Veränderungen innerhalb der Proteinfraction resultieren. Bei der Interpretation muss außerdem bedacht werden, dass durch die Freisetzung und Abtrennung der unterschiedlichen Substituenten auch das M_w beeinflusst werden kann. Das größte Problem bei der Entesterung von Pektinen durch Lauge ist jedoch, dass bei basischen Bedingungen nicht nur die Methyl-, Acetyl- und Ferulasäureester verseift werden, sondern auch Spaltungen des Galacturonanrückgrats auftreten können (Albersheim 1959; Albersheim *et al.* 1960; BeMiller und Kumari 1972). Die Spaltung des Rückgrats erfolgt dabei anhand eines β -Eliminierungsmechanismus von methylierten Galacturonsäureeinheiten (Abbildung 6). Der Anteil an β -Eliminierung und der Freisetzung estergebundener Substituenten kann jedoch durch die Wahl der Reaktionsbedingungen gesteuert werden. Temperaturerhöhungen führen zu einem stärkeren Anstieg von β -Eliminierungsreaktionen als von Demethylierungen, wohingegen eine Erhöhung des pH-Werts verstärkt zu Demethylierungsreaktionen führt (Kravtchenko *et al.* 1992; Renard und Thibault 1996). Dementsprechend sollte die Verseifung von Pektinen einerseits bei möglichst niedrigen Temperaturen durchgeführt werden, andererseits sollte die Einstellung eines geeigneten pH-Werts einen hohen Entesterungsgrad bei gleichzeitig geringfügiger Modifikation des Galacturonanrückgrats ermöglichen.

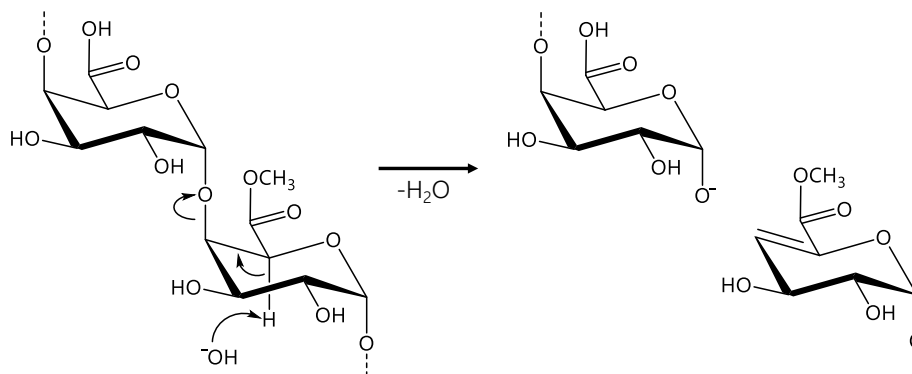


Abbildung 6: Mechanismus der basekatalysierten, *trans*-eliminativen Spaltung („ β -Eliminierung“) einer Galacturonankette an einer methylveresterten Galacturonsäureeinheit

In der vorliegenden Arbeit wurde das zur Entesterung eingesetzte SBP daher mit einem definierten Volumen vorgekühlter Natronlauge (4 °C) versetzt. Zusätzlich wurde der Reaktionsansatz während der Alkalibehandlung in einem Eisbad gekühlt, um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von β -Eliminierungsreaktionen zu reduzieren. Aus Vorversuchen wurde eine Laugenkonzentration von 3 mmol NaOH/g Pektin als gerade ausreichend ermittelt, um eine partielle Verseifung des gewählten SBP zu gewährleisten und gleichzeitig das Risiko von Spaltungen des Galacturonanrückgrats zu minimieren. Um unterschiedlich stark entesterte Pektine zu erhalten, wurden zwei Reaktionen mit der gleichen

3 Material und Methoden

Laugenkonzentration (3 mmol NaOH/g Pektin), aber unterschiedlichen Behandlungsdauern (15 bzw. 180 min) angesetzt. Nach der jeweiligen Behandlungsperiode wurde die Verseifung durch Anpassung des pH-Werts auf 4 gestoppt. Die anschließende Aufarbeitung der modifizierten Pektine erfolgte analog zur Aufarbeitung im Zuge der Pektinextraktion (siehe Abschnitt 4.1) durch Isopropanol (IPA)-Fällung und anschließendes Waschen mit 70 %igem IPA und reinem IPA zur Abtrennung der freigesetzten Substituenten. Nach Trocknung (50 °C; 2 h) wurden die modifizierten Pektine gemahlen ($\varnothing < 0,5$ mm) und deren Struktur- sowie Emulgierereigenschaften charakterisiert. Die Arbeitsvorschrift zur gezielten Modifikation des Veresterungsgrads eines SBP ist in Abschnitt 8.3.1 zu finden.

3.3.2 ENZYMATISCHE MODIFIKATION VERSCHIEDENER STRUKTURELEMENTE

Während keine geeigneten Pektinmethylesterasen bzw. -acetylerasen zur Verfügung standen, konnten verschiedene kommerziell erhältliche Enzympräparate zur Modifikation des Pektinrückgrats (PGA), der neutralen Seitenketten (*endo*- α -1,5-L-Arabinanase, *endo*- β -1,4-D-Galactanase, Ferulasäureesterase) und der Proteinfraction (Subtilisin A Protease) eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Enzympräparate ist, dass deren spezifische Aktivitäten und mögliche Nebenaktivitäten üblicherweise bekannt sind. Allerdings sind die Aktivitätsangaben meist auf einfache Modellsubstrate unter definierten Inkubationsbedingungen bezogen, sodass die angegebenen Enzymaktivitäten nur bedingt auf SBP übertragen werden können. Des Weiteren sind die eingesetzten Enzyme nur teilweise rekombinant gewonnen (s. Anhang, Tabelle 20). Bei nicht-rekombinant gewonnenen Enzymen sind unerwünschte Nebenaktivitäten möglich, da die zur Enzymherstellung eingesetzten Mikroorganismen üblicherweise eine Vielzahl an pektinmodifizierenden Enzymen produzieren, welche meist nicht vollständig von dem Zielenzym abgetrennt werden.

Die zur Modifizierung unterschiedlicher Pektinstrukturelemente eingesetzten Enzymaktivitäten sowie die entsprechenden Inkubationsbedingungen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Während die Inkubationstemperatur (40 °C) für alle Enzyme nah am Optimum liegt, weicht der gewählte pH-Wert (6) bei einigen Enzymen von den idealen Umgebungsbedingungen ab. Der pH-Wert wurde dennoch gewählt, da alle Enzyme laut Herstellerangaben bei pH 6 Aktivität aufweisen und so lediglich eine einzelne Kontrollprobe mitgeführt werden musste. Da nicht am pH-Optimum gearbeitet wurde, ist jedoch auch teilweise mit verminderten Enzymaktivitäten zu rechnen. Der Kontrollansatz ohne Enzymzugabe dient dazu, die Auswirkungen der 24-stündigen Behandlung bei pH 6 und 40 °C, der anschließenden Hitzebehandlung zur Enzyminaktivierung (95 °C; 5 min) sowie der weiteren Aufarbeitung auf die Struktur und die funktionellen Eigenschaften des Pektins zu berücksichtigen. Unter anderem könnte die langandauernde Inkubation sowie die kurzzeitige Hitzebehandlung aufgrund des vergleichsweise hohen pH-Werts zu Spaltungen innerhalb der Galacturonanfraktion durch β -Eliminierungsreaktionen führen (Albersheim 1959). Die Aufarbeitung der modifizierten Pektine

erfolgte analog zur Aufarbeitung der alkalisch entesterten Pektine (siehe Abschnitt 3.3.1). Die Arbeitsvorschrift zur enzymatischen Modifikation verschiedener Strukturelemente eines SBP ist in Abschnitt 8.3.2 zu finden.

Tabelle 1: Zur unterschiedlichen enzymatischen Modifikation eines Zuckerrübenpektins verwendete Inkubationsbedingungen und Enzymaktivitäten. AA: *endo*- α -1,5-L-Arabinanase, FAE: Ferulasäureesterase, GA: *endo*- β -1,4-D-Galactanase, KP: Kontrollprobe ohne Enzymzugabe, PGA: *endo*- α -1,4-D-Polygalacturonase, PROT: Protease (Subtilisin A)

	KP	AA	GA	PROT	FAE	PGA
Enzymaktivität / U/g	-	5	10	18	0,05	5
pH-Wert	6	6	6	6	6	6
Temperatur / °C	40	40	40	40	40	40
Zeit / h	24	24	24	24	24	1

3.3.3 ENZYMATISCHE MODIFIKATION DER ARABINANFRAKTION

Für eine nähergehende Untersuchung der Struktur-Eigenschaftszusammenhänge wurden weitere Inkubationsansätze mit arabinanmodifizierenden Enzymen durchgeführt. Neben *endo*- α -1,5-L-Arabinanase wurde auch eine α -L-Arabinofuranosidase eingesetzt. Die Enzympräparate unterscheiden sich darin, dass *endo*- α -1,5-L-Arabinanase die Hydrolyse des Arabinanrückgrats katalysiert, während α -L-Arabinofuranosidase vorwiegend an den Seitenketten der Arabinane durch Abspaltung endständiger Arabinoseeinheiten agiert. Dementsprechend sollten getrennte Inkubationen mit den jeweiligen Enzympräparaten dazu führen, dass Pektine mit unterschiedlichen Arabinanstrukturen erhalten werden.

Für die Modifikationsansätze wurden *endo*- α -1,5-L-Arabinanase und α -L-Arabinofuranosidase aus *Aspergillus niger* eingesetzt (s. Anhang, Tabelle 20). Die Inkubationen wurden am pH- (4) und Temperaturoptimum (40 °C) der Enzyme für 24 h durchgeführt. Um unterschiedlich stark modifizierte SBP zu erhalten, wurden für jedes Enzym zwei Ansätze mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten (jeweils 10 U/g und 40 U/g) durchgeführt. Die gewählten Enzymaktivitäten orientierten sich an den *endo*- α -1,5-L-Arabinanase Konzentrationen, die beim enzymatischen Profiling von Arabinanseitenketten nach Wefers und Bunzel (2016a) eingesetzt werden (200 U/g). Die Wahl geringerer Enzymaktivitäten ist darauf zurückzuführen, dass im Gegensatz zum Arabinanprofiling der vollständige Verdau der enzymatisch zugänglichen Arabinane kein vorrangiges Ziel war. Zudem wären die Kosten für die spezifischen Enzyme aufgrund des für die Analyse der Emulgierereigenschaften notwendigen großen Versuchsansatzes (3 g Pektin) unverhältnismäßig hoch. Da die Inkubationen am pH- und Temperaturoptimum durchgeführt wurden, sollte dennoch ein weitgehender enzymatischer Verdau gewährleistet sein.

3 Material und Methoden

Im Anschluss an die 24-stündige Inkubation wurden die vier Inkubationsansätze zusammen mit einer Referenzprobe ohne Enzymzugabe zur Enzyminaktivierung hitzebehandelt (95 °C; 5 min). Die Aufarbeitung der modifizierten Pektine erfolgte analog zur Aufarbeitung der alkalisch entesterten Pektine (siehe Abschnitt 3.3.1). Arbeitsvorschrift zur enzymatischen Modifikation der Arabinanfraktion eines SBP ist in Abschnitt 8.3.3 zu finden.

3.3.4 ENZYMATISCHE MODIFIKATION DER GALACTURONANFRAKTION

Die enzymatische Modifikation des Galacturonanrückgrats kann durch den Einsatz unterschiedlicher Enzyme hervorgerufen werden, die sich sowohl in der Substratspezifität als auch im Wirkmechanismus unterscheiden. So katalysiert PGA die hydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindungen zwischen nicht-methylveresterten α -1,4-D-Galacturonsäureeinheiten (Mohamed *et al.* 2003). Pektinlyasen (PLY) und Pektatlyasen spalten dagegen die glykosidische Bindung über einen β -Eliminierungsmechanismus, sodass 4,5-ungesättigte Galacturonsäureoligosaccharide gebildet werden. PLY und Pektatlyasen unterscheiden sich durch ihre Substratspezifitäten: PLY spalten die glykosidischen Bindungen an methylveresterten Galacturonsäureeinheiten, während Pektatlyasen bei nicht-methylveresterten Galacturonsäureeinheiten aktiv sind (Zheng *et al.* 2021).

Zur Modifikation des Galacturonsäurerückgrats wurde in dieser Arbeit eine Mischung aus PGA und PLY eingesetzt. Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifitäten von PGA und PLY sollten unabhängig vom Veresterungsgrad des zu modifizierenden Pektins entlang der gesamten Galacturonankette zufällige Spaltungen induziert werden, die in einer Reduktion der Kettenlänge und somit des M_w des Pektins resultieren sollten. Die eingesetzten Enzyme wurden rekombinant in *Trichoderma reesei* exprimiert (s. Anhang, Tabelle 20) und zeichnen sich insbesondere dadurch aus, dass die pH-Optima im sauren Bereich liegen (Mohamed *et al.* 2003). Daher musste der pH-Wert der SBP-Lösungen für die Enzyminkubationen nur geringfügig angepasst werden (pH 3,5). Zur Ermittlung geeigneter Enzymaktivitäten wurden zunächst verschiedene Vorversuche mit einem strukturell ähnlichen Substrat durchgeführt. Darauf aufbauend wurden bei einer Inkubationstemperatur von 40 °C 9 U PGA und 15 U PLY pro g SBP eingesetzt. Um unterschiedlich stark ausgeprägte Modifikationen des Pektinrückgrats zu erreichen, wurden drei Ansätze mit unterschiedlichen Inkubationsdauern durchgeführt (20 min, 60 min und 180 min). Als Referenzprobe wurde ein Ansatz mitgeführt, der ohne Enzymzugabe ebenfalls für 180 min inkubiert wurde. Nach der jeweiligen Inkubationsperiode wurden die Proben hitzebehandelt (95 °C; 5 min), um die Enzymaktivität zu stoppen. Die Aufarbeitung der modifizierten Pektine erfolgte analog zur Aufarbeitung der alkalisch entesterten Pektine (siehe Abschnitt 3.3.1). Die Arbeitsvorschrift zur enzymatischen Modifikation der Galacturonanfraktion eines SBP ist in Abschnitt 8.3.4 zu finden.

3.4 CHARAKTERISIERUNG DER EMULGIEREIGENSCHAFTEN

Um die Pektinstrukturen mit den Emulgiereigenschaften in Verbindung setzen zu können, wurden mit allen untersuchten Pektinen Modellemulsionen hergestellt. Bei der Herstellung von Emulsionen ist zu beachten, dass die Formulierung (u.a. Ölanteil, pH-Wert, Salzzugabe), die Emulgiermethode und der eingebrachte Energieeintrag (u.a. Rotor-Stator-Systeme, Hochdruckhomogenisation) und mögliche Nachbehandlungen (z.B. Pasteurisation) Auswirkungen auf die Emulgiereigenschaften von SBP haben können (Bindereif *et al.* 2022; Bindereif *et al.* 2023). Dementsprechend ist es denkbar, dass bei unterschiedlich hergestellten Emulsionen auch unterschiedliche Struktur-Eigenschaftszusammenhänge beobachtet werden können. Für die vorliegende Arbeit wurden daher alle Modellemulsionen unter identischen Bedingungen hergestellt (10 % (v/v) Öl; 0,5 % (w/v) SBP in der dispersen Phase (pH 5,0); Hochdruckhomogenisation bei 400 bar), weshalb die diskutierten Struktur-Eigenschaftszusammenhänge auch stets auf diese Emulgierbedingungen bezogen sind.

Die Arbeiten zur Charakterisierung der Emulgiereigenschaften der Pektine wurden von Benjamin Bindereif am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik (Organisationseinheit Lebensmittelverfahrenstechnik) des Karlsruher Instituts für Technologie durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 0,5 %ige Lösungen der jeweiligen Pektine durch 30-sekündige Ultra-Turrax®-Behandlung mit 10.000 rpm bei 60 °C hergestellt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der pH mit 1 M Natronlauge auf 5,0 eingestellt. Die Emulsionsherstellung erfolgte zweistufig. Zunächst wurde durch 60-sekündige Ultra-Turrax®-Behandlung mit 15.000 rpm eine Rohemulsion aus 90 % Pektinlösung und 10 % Öl (v/v) hergestellt. Als Öl wurde ein mittelkettiges Triglycerid (MCT) Öl der Schumann & Sohn GmbH (Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt, das nach Herstellerangaben zu 60 % aus C₈-Fettsäuren und zu 40 % aus C₁₀-Fettsäuren zusammengesetzt ist und bei Raumtemperatur eine Dichte von 0,95 kg/L aufweist. Zur Herstellung einer Feinemulsion wurde die Rohemulsion in einem Hochdruckhomogenisator bei 400 bar behandelt.

Im Vergleich zu den analytischen Methoden werden für die Betrachtung der Emulgiereigenschaften hohe Mengen an Probenmaterial benötigt. Gleichzeitig standen lediglich begrenzte Mengen an labortechnisch extrahierten und gegebenenfalls zusätzlich modifizierten Pektinen zur Verfügung. Daher wurden die Emulsionen lediglich bei ausgewählten Proben dreifach hergestellt. Da hierbei eine hohe Reproduzierbarkeit (Standardabweichung < 2 %) beobachtet werden konnte (siehe Tabelle 12), wurden die Emulsionen bei allen anderen Proben einfach hergestellt. Direkt nach der Hochdruckhomogenisation sowie nach 30 Tagen Lagerung bei 5 °C wurden die Tropfengrößenverteilungen der Emulsionen mittels statischer Lichtstreuung in Dreifachbestimmung analysiert. In der vorliegenden Arbeit werden jedoch fast ausschließlich die Tropfengrößenverteilungen direkt nach Herstellung der Emulsionen diskutiert, da bei den meisten Proben keine relevante Veränderung der Tropfengrößenverteilungen nach 30 Tagen Lagerung beobachtet werden konnte. Die Emulsionsstabilität wird lediglich bei den Proben

3 Material und Methoden

eingeorordnet, bei denen eine deutliche Veränderung der Tropfengrößenverteilung beobachtet und damit von einer verminderten Lagerstabilität ausgegangen werden konnte.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Tropfengrößenverteilungen und damit der Emulgierereigenschaften der Pektine zu ermöglichen, wurde der $x_{90,3}$ -Wert als Referenzwert gewählt, der das 90. Perzentil der volumenbezogenen, kumulativen Tropfengrößenverteilung darstellt. Kleinere $x_{90,3}$ -Werte und damit kleinere mittlere Tropfengrößen können vereinfacht gesagt mit besseren Emulgierereigenschaften in Verbindung gebracht werden. Bei den gewählten Emulgierbedingungen können $x_{90,3}$ -Werte $< 1 \mu\text{m}$ als hervorragend angesehen werden. In Abbildung 7 ist beispielhaft die Tropfengrößenverteilung von Modellemulsionen dargestellt, die mit zwei Pektinen mit unterschiedlichen Emulgierereigenschaften hergestellt wurden. Die beiden Tropfengrößenverteilungen unterscheiden sich insofern, dass bei der in schwarz dargestellten Probe durchschnittlich deutlich kleinere Tropfen vorliegen als bei der in grün dargestellten Probe. Dies spiegelt sich auch in unterschiedlichen $x_{90,3}$ -Werten wider und zeigt an, dass die in schwarz dargestellte Probe unter den gegebenen Emulgierbedingungen und dem Außenvorlassen der Lagerstabilität deutlich bessere Emulgierereigenschaften aufweist als die in grün dargestellte Probe.

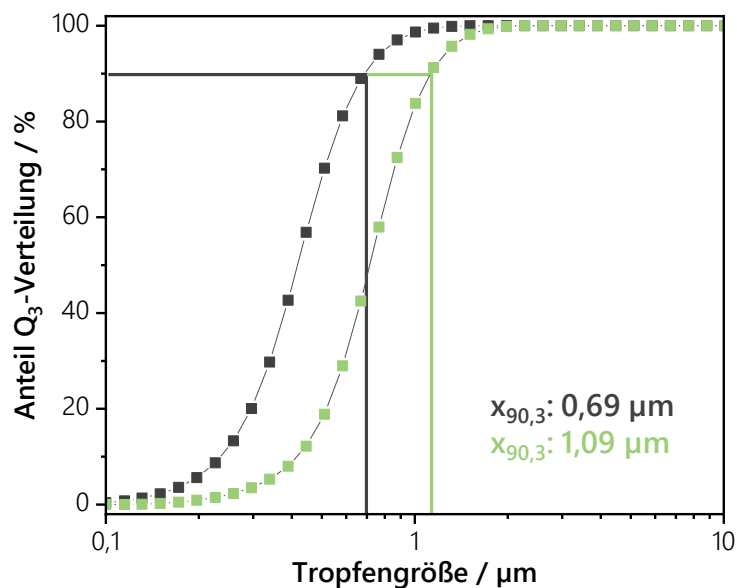


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der kumulativen, volumenbezogenen Öltropfengrößenverteilungen von zwei Pektinen mit unterschiedlichen Emulgierereigenschaften. Die horizontalen und vertikalen Linien sind zur Veranschaulichung der Ermittlung des $x_{90,3}$ -Werts eingezeichnet, der das 90. Perzentil dieser Verteilung angibt

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 ENTWICKLUNG VON METHODEN ZUR PEKTINEXTRAKTION AUS ZUCKERRÜBENSCHNITZELN

Voraussetzung für die Aufklärung der funktionellen Zusammenhänge zwischen Extraktionsmethodik, Ausbeute, molekularer Struktur und Emulgierereigenschaften ist die Entwicklung bzw. Optimierung verschiedener Methoden zur Extraktion von Pektinen aus Zuckerrüben bzw. Zuckerrübenschnitzeln. Ziel der Anwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden ist die Darstellung von Pektinen mit einer großen Bandbreite an strukturellen Charakteristika. Dementsprechend wurden nicht nur unterschiedliche Extraktionsmethoden, sondern auch unterschiedliche Prozessbedingungen eingesetzt. Industriell werden Pektine üblicherweise unter harschen Extraktionsbedingungen gewonnen, die zwar in hohen Ausbeuten resultieren, aber auch mit in einer starken Modifizierung der Pektinstruktur einhergehen. Ein besonderes Augenmerk lag daher auf der Anwendung vergleichsweise milder Prozessbedingungen, sodass auch Pektine gewonnen werden können, die im Zuge der Extraktion nur geringfügig modifiziert wurden. Neben einem umfassenderen Bild der Zusammenhänge zwischen der Struktur und den Emulgierereigenschaften von SBP sollten hierdurch auch Rückschlüsse über die nativ vorliegende Pektinstruktur ermöglicht werden.

In dieser Arbeit wurden neben Säureextraktionen (Erhitzung unter Zugabe verdünnter Mineralsäuren) auch enzymunterstützte Verfahren sowie Autoklavenextraktionen zur Pektingewinnung eingesetzt.

4.1.1 SÄUREEXTRAKTIONEN

PROBENVORBEREITUNG. Vor der eigentlichen Extraktion erfolgte zunächst eine rohstoffabhängige Vorbereitung des Ausgangsmaterials. Ein entscheidender Punkt ist hierbei die Beschaffenheit des Rohstoffs. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zuckerrübenschnitzeln handelte sich um getrocknete, gekalkte Rübenschnitzel. Ohne vorherige Zerkleinerung konnten bei kurzen Extraktionszeiten nur geringe Ausbeuten realisiert werden, wodurch weiterführende Versuche zur Funktionalität nicht möglich waren. Das Mahlen des Ausgangsmaterials resultierte jedoch in einer erheblichen Ausbeutesteigerung. Bei einer milden Säureextraktion (1 h; pH 2; 80 °C) konnte beispielsweise bei Zerkleinerung auf einen Partikeldurchmesser < 0,5 mm die Ausbeute von ursprünglich 2,4 % auf 15,6 % vervielfacht werden. Die verbesserte Extrahierbarkeit kann durch die starke Oberflächenvergrößerung im Zuge des Mahlprozesses erklärt werden. Besonders stark wirkt sich dieser Effekt bei kurzen Extraktionszeiten aus (1, 2 und 4 h), während bei 16 h Extraktionszeit auch ohne vorherige Zerkleinerung des Ausgangsmaterials hohe Ausbeuten erzielt werden können (Abbildung 8). Um auch bei verkürzten Extraktionszeiten

4 Ergebnisse und Diskussion

ausreichend Probenmaterial zu generieren, wurden daher, wenn nicht anderweitig beschrieben, alle nachfolgenden Extraktionen mit gemahlene Zuckerrübenschnitzeln ($\varnothing < 0,5 \text{ mm}$) durchgeführt.

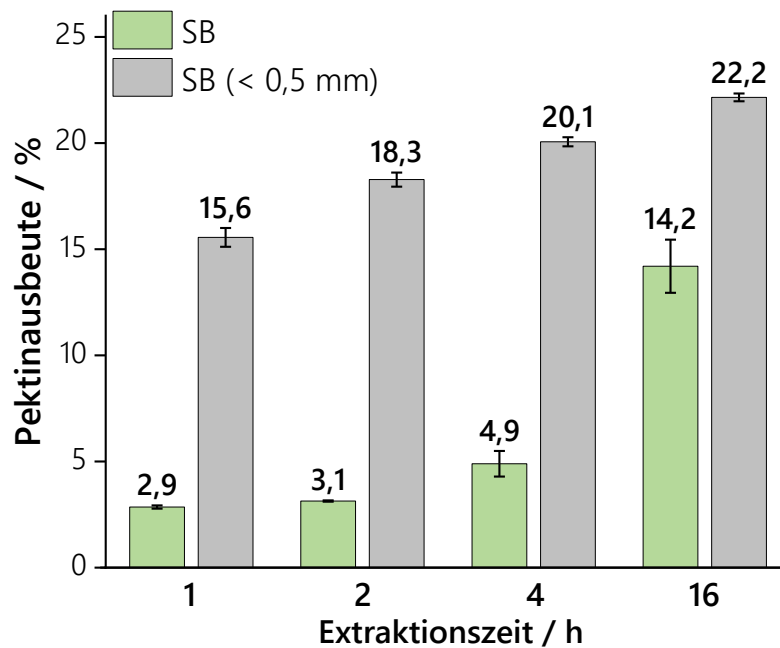


Abbildung 8: Prozentuale Ausbeuten an Pektin nach Extraktion aus ungemahlene (grün, $n = 2$) und gemahlene ($\varnothing < 0,5 \text{ mm}$, grau, $n = 3$) Zuckerrübenschnitzeln (SB). Die Extraktionen wurden bei pH 2 und $80 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1, 2, 4 bzw. 16 h durchgeführt

Neben dem Mahlgrad spielt auch die Hydratisierung des Ausgangsmaterials eine Rolle. Das Verhältnis von Feststoff zu Flüssigkeit (S/L) wurde so gewählt, dass eine vollständige Hydratisierung des Ausgangsmaterials und damit auch eine korrekte Einstellung des pH-Werts ermöglicht wurde. Für gemahlene Zuckerrübenschnitzel reichte hierbei ein S/L von $1 \text{ g}/10 \text{ mL}$ vollentsalztes (VE) Wasser aus, da eine weitere Erhöhung des Wasseranteils keine Ausbeutesteigerung zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt). Ein Vorteil geringer S/L ist zudem die Einsparung von IPA bei der späteren Fällung. Nach Zugabe des wässrigen Extraktionsmediums ist eine ausreichende Äquilibrierungszeit einzuräumen, um eine korrekte Einstellung des pH-Werts des Extraktionsansatzes gewährleisten zu können. Die in dieser Arbeit diskutierten SBP wurden vor der Einstellung des jeweiligen pH-Werts für 1 h bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ im Schüttelinkubator behandelt.

EXTRAKTION. Der anschließend durch Salpetersäure- (pH 2 - 4) bzw. Natronlaugezugabe (pH 6) eingestellte pH-Wert sowie die Extraktionsdauer (1 - 16 h) wurden umfangreich variiert, sodass Pektine mit unterschiedlichen strukturellen Charakteristika gewonnen werden konnten. Teilweise wurde vor der Einstellung des pH-Werts Citronensäure zugegeben (0 - 100 mM). Über die Komplexbildung mit Ca^{2+} -Ionen sollte die Pektinfreisetzung bei Methoden verbessert werden, bei denen der pH-Wert des Extraktionsmediums nicht oder nur geringfügig durch Säurezugabe erniedrigt wurde. Aufgrund der vergleichsweise hohen pK_{S} -Werte von Citronensäure ($\text{pK}_{\text{S}1}$: 3,1; $\text{pK}_{\text{S}2}$: 4,8; $\text{pK}_{\text{S}3}$: 6,4) konnte für SBP nur bei den bei pH 6 durchgeführten Extraktionen eine deutliche Auswirkung der Citronensäurezugabe auf die Pektinausbeute sowie die

4.1 Entwicklung von Methoden zur Pektinextraktion aus Zuckerrübenschnitzeln

Emulgierereigenschaften beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Extraktion aller beschriebenen säureextrahierten Pektine erfolgte im Wasserbad bei einer Temperatur von 80 °C. Die Temperatur wurde nicht variiert, da Yapo *et al.* (2007a) zeigen konnten, dass der Einfluss der Temperatur im Vergleich zum pH-Wert oder der Extraktionszeit schwächer ausgeprägt ist und dementsprechend geringere Veränderungen in der Pektinstruktur durch die Variation dieses Parameters zu erwarten sind. Die Auswirkungen unterschiedlicher Extraktionsbedingungen werden in den anschließenden Abschnitten diskutiert.

PRÄZIPITATION. Nach Abtrennung des unlöslichen Rückstands wurde der wässrige Extrakt durch die Zugabe von IPA ausgefällt. Das Verhältnis von wässrigem Extrakt zu organischem Lösungsmittel hat einen großen Einfluss auf die Ausbeute sowie die Struktur und Eigenschaften des Präzipitats. Die Auswirkungen unterschiedlicher IPA-Anteile können anhand einer stufenweisen Fällung eines durch einstündige Extraktion (pH 2; 80 °C) gewonnenen, wässrigen Extrakts aufgezeigt werden. Bei der stufenweisen Fällung wurde zum wässrigen Extrakt zunächst IPA bis zu einem Anteil von 20 % zugegeben. Das Präzipitat („20 % Fraktion“) wurde abgetrennt und der IPA-Anteil des Überstands anschließend auf 40 % erhöht. Nach Abtrennung des Präzipitats („20 - 40 % Fraktion“) wurde der Anteil schlussendlich auf 70 % eingestellt und das Präzipitat abermals abgetrennt („40 - 70 % Fraktion“). Um die Auswirkungen unterschiedlicher IPA-Anteile aufzuzeigen, wurden die strukturellen Eigenschaften und die Emulgierereigenschaften der drei Fraktionen analysiert. In Tabelle 2 sind die Ausbeuten, relevanten Strukturparameter sowie die $x_{90,3}$ -Werte der erhaltenen Fraktionen dargestellt.

Tabelle 2: Pektinausbeuten (n = 2), Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und $x_{90,3}$ -Werte (n = 3) von stufenweise mit Isopropanol gefällten Zuckerrübenpektinen (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Die Pektine wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. DAC: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, *t*-FA: *trans*-Ferulasäuregehalt, M_w : Molekulargewicht (Gewichtsmittel), n.b.: nicht bestimmt, $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	Isopropanolanteil / %		
	20	20 - 40	40 - 70
Ausbeute / %	0,5	4,7	10,8
$x_{90,3}$ / μm	n.b.	1,17 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01
M_w / kDa	219 \pm 3	133 \pm 8	548 \pm 33
Proteingehalt / %	16,3 \pm 0,3	10,6 \pm 0,1	4,1 \pm 0,1
DM / %	64,3 \pm 0,1	76,6 \pm 1,1	73,7 \pm 0,4
DAC / %	43,2 \pm 1,9	26,7 \pm 0,3	55,7 \pm 0,1
<i>t</i>-FA / mg/100 g	299 \pm 8	390 \pm 1	936 \pm 1

Die erhaltenen Fraktionen unterscheiden sich sowohl in Bezug auf die Extraktausbeuten als auch strukturell deutlich voneinander. Die Emulgierereigenschaften der 20 % Fraktion konnten aufgrund der zu geringen Ausbeute (0,5 %) nicht bestimmt werden. Die 20 - 40 % Fraktion, die

4 Ergebnisse und Diskussion

etwa ein Drittel der Gesamtausbeute ausmachte, wies mit einem $x_{90,3}$ -Wert von 1,17 μm deutlich schlechtere Emulgierereigenschaften auf als die bei einem höheren IPA-Anteil erhaltene Fraktion ($x_{90,3}$: 0,68 μm). Im Vergleich zur 20 - 40 % Fraktion ist die 40 - 70 % Fraktion unter anderem durch einen niedrigeren Proteingehalt, ein erheblich höheres M_w sowie einen höheren Acetylierungsgrad und einen deutlich erhöhten Gehalt an *trans*-Ferulasäure gekennzeichnet. Bei strukturell ähnlichen Polysaccharidfraktionen wären geringere M_w bei den Fraktionen zu erwarten, die erst bei höheren IPA-Anteilen präzipitieren (Xu *et al.* 2014). Dass die 40 - 70 % Fraktion trotz höherem M_w erst bei erhöhten IPA-Anteilen ausgefällt werden konnte, kann vermutlich auf den deutlich höheren Acetylierungsgrad sowie den stark erhöhten Anteil estergebundener *trans*-Ferulasäure zurückgeführt werden. Diese Komponenten erhöhen die Hydrophobizität der Pektine und beeinflussen so unter anderem die Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel bzw. die intermolekulare Aggregation. Diese Ergebnisse verdeutlichen einmal mehr den komplexen strukturellen Aufbau von SBP und den Einfluss der Fällung auf die Struktur und Eigenschaften des entsprechenden Präzipitats.

Auch in der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharidfraktionen (Abbildung 9) gibt es erhebliche Unterschiede zwischen den Präzipitaten. Auffällig ist insbesondere der erhöhte Anteil an Rhamnose, Galacturonsäure und Galactose der 40 - 70 % Fraktion, der auf einen erhöhten Anteil an RG-I sowie AG-I- bzw. AG-II-Motiven hinweist. Bei den zuerst ausfällbaren Fraktionen deuten die hohen Arabinose zu Galactose und Rhamnose-Verhältnisse hingegen auf erhöhte Arabinan- bzw. niedrigere RG-I- und Galactananteile hin. Zusammen mit den geringeren M_w könnte darauf geschlossen werden, dass es sich zumindest teilweise um freie Arabinane handelt, die nicht direkt mit dem Pektinrückgrat verknüpft sind. Allerdings wird das niedrigere M_w der Fraktionen 20 % und 20 - 40 % vermutlich auch durch die Koextraktion von glucosehaltigen Strukturen bedingt, die nicht mit den Pektinstrukturen verbunden sind. In der 40 - 70 % Fraktion ist der Glucoseanteil hingegen sehr niedrig, was darauf schließen lässt, dass bei der Extraktion von SBP der Großteil der koextrahierten Nicht-Pektinpolysaccharide bei einem IPA-Anteil von unter 40 % ausgefällt wird. Neben den deutlichen strukturellen Unterschieden in den Pektinmotiven können unter anderem diese erhöhten Anteile an Nicht-Pektinpolysacchariden und damit die verringerten effektiven Emulgatorkonzentrationen die unterschiedlichen Emulgierereigenschaften der verschiedenen Fraktionen erklären.

Zur detaillierten Untersuchung der extrahierten Polysaccharide wurden zusätzlich die glykosidischen Bindungsverhältnisse der Neutralzuckerfraktionen mittels Methylierungsanalyse analysiert. In Tabelle 3 sind auszugsweise die Bindungstypen der Hauptbestandteile Arabinose, Galactose und Rhamnose dargestellt. Für die vollständigen Ergebnisse inklusive der Bindungstypen von Xylose und Glucose sowie der dazugehörigen Standardabweichungen wird auf den Anhang verwiesen (Tabelle 28).

4.1 Entwicklung von Methoden zur Pektinextraktion aus Zuckerrübenschnitzeln

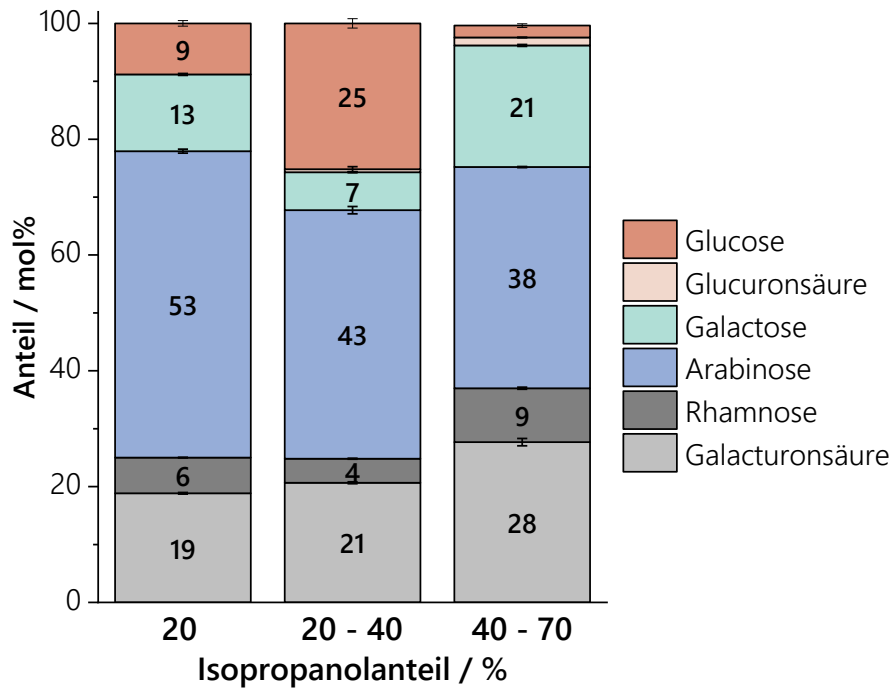


Abbildung 9: Monosaccharidzusammensetzungen der stufenweise mit Isopropanol gefällten Pektine, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3). Die Extrakte wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen

Die Arabinanmotive der untersuchten Pektinfraktionen weisen neben hohen Anteilen an linear verknüpften 1,5-Arabinoseeinheiten allesamt auch bedeutende Anteile an 1,3,5- und 1,2,3,5-verknüpften Arabinoseeinheiten auf, weshalb von einer komplexen Arabinanarchitektur der SBP-Fractionen ausgegangen werden kann. Insbesondere bei Betrachtung der auf die Arabinosebindungstypen bezogenen Anteile (%Ara) fällt jedoch auf, dass der Verzweigungsgrad der 20 - 40 % Fraktion geringer ist als bei der zuerst und der zuletzt ausgefallenen SBP-Fraktion. Auffällig ist zudem der erhöhte Anteil an terminalen Arabinopyranoseeinheiten der 20 - 40 % Fraktion. Zusätzlich zum komplexeren Aufbau der Arabinanfraktionen kann aus dem Verhältnis von 1,2- zu 1,2,4-verknüpften Rhamnoseeinheiten geschlossen werden, dass die RG-I-Fractionen der 20 % und 40 - 70 % Fraktionen durch einen höheren Substitutionsgrad mit neutralen Seitenketten gekennzeichnet sind. Auch die Anteile an Galactanen sowie deren Zusammensetzung unterscheidet sich deutlich in Abhängigkeit vom IPA-Anteil. Zwar sind alle Galactanfraktionen sowohl durch Galactan- bzw. AG-I- (1,4-, 1,2,4-, 1,3,4-Verknüpfungen) als auch AG-II-Motive (1,3-, 1,6-, 1,3,6-Verknüpfungen) gekennzeichnet, jedoch unterscheiden sich diese in den Anteilen sowie dem Verzweigungsgrad. Auffällig ist insbesondere der hohe relative Anteil an 1,3,6-Galactoseeinheiten der 20 % Fraktion, der auf eine stark verzweigte AG-II-Struktur hinweist. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese strukturelle Besonderheit mit dem stark erhöhten Proteingehalt und dem vermehrten Vorliegen von AGP in dieser SBP-Fraktion zusammenhängt. Doch auch die Galactane der 20 - 40 % und 40 - 70 % Fraktionen weisen hohe Anteile an 1,3,6-Galactoseeinheiten und allgemein hohe Verzweigungsgrade auf, sodass auf eine generell hohe Komplexität der Galactane von SBP geschlossen werden kann.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Anteile der glykosidischen Bindungen (mol%) der stufenweise mit Isopropanol gefällten Zuckerrübenpektine, bestimmt mittels Methylierungsanalyse (n = 2). Die Pektine wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Auszugsweise Darstellung der Arabinose-, Galactose- und Rhamnosebindungstypen. Für die vollständige Tabelle (inkl. Range/2) wird auf den Anhang verwiesen (Tabelle 28). Die Anteile der einzelnen Bindungstypen sind sowohl bezogen auf die Gesamtheit aller Bindungstypen (%Ges) als auch bezogen auf den Anteil an allen Bindungstypen des jeweiligen Monosaccharids (%Ara, %Gal, %Rha) dargestellt. Die Prozentangaben der Spaltenbeschriftungen geben den Bereich des IPA-Anteils an, bei dem die jeweilige Fraktion präzipitiert wurde. Ara: Arabinose, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, n.q.: nicht quantifiziert, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, SBP: Zuckerrübenpektin, t: terminal, Xyl: Xylose

Glykosidische Bindungstypen		Isopropanolanteil / %					
		20		20 - 40		40 - 70	
		%Ges	%Ara	%Ges	%Ara	%Ges	%Ara
Arabinose	t-Araf	19,6	35,5	29,7	38,3	28,8	38,5
	t-Arap	0,3	0,5	3,3	4,3	0,5	0,7
	1,2-Araf	0,6	1,1	1,7	2,2	0,9	1,2
	1,3-Araf	1,2	2,2	4,7	6,1	1,8	2,4
	1,5-Araf	17,3	31,3	22,9	29,5	21,1	28,2
	1,3,5-Araf	13,2	23,9	12,0	15,5	16,3	21,8
	1,2,5-Araf	1,1	2,0	1,7	2,2	2,1	2,8
	1,2,3,5-Araf	1,9	3,4	1,6	2,1	3,3	4,4
		%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal
Galactose	t-Galp	1,6	22,9	2,0	27,8	3,6	21,7
	1,3-Galp	0,7	10,0	0,6	8,3	1,8	10,8
	1,4-Galp	1,6	22,9	1,6	22,2	5,3	31,9
	1,6-Galp	1,2	17,1	1,6	22,2	2,9	17,5
	1,2,4-Galp	n.q.	0,0	0,2	2,8	0,2	1,2
	1,3,4-Galp	0,2	2,9	0,3	4,2	0,5	3,0
	1,3,6-Galp	1,7	24,3	0,9	12,5	2,3	13,9
		%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha
Rhamnose	1,2-Rhap	0,8	53,3	1,2	63,2	2,7	46,6
	1,2,4-Rhap	0,7	46,7	0,7	36,8	3,1	53,4

Zusammenfassend ist die IPA-Fraktion mit den besseren Emulgierereigenschaften (40 - 70 %) durch einen erhöhten Galactananteil, einen höheren Verzweigungsgrad der Arabinanfraktion sowie einen höheren Substitutionsgrad des RG-I-Rückgrats gekennzeichnet. Dementsprechend deuten die Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen dem strukturellen Aufbau und insbesondere der Komplexität der Polysaccharidfraktion und den Emulgierereigenschaften hin. Allerdings ist zu beachten, dass sich die untersuchten Fraktionen unter anderem auch deutlich im Anteil an koextrahierten Nicht-Pektinpolysacchariden unterscheiden.

Neben der Polysaccharid- wird auch die Proteinfraction von dem IPA-zu-Extrakt Verhältnis beeinflusst. Der Proteingehalt ist in der zuerst ausgefällten Fraktion mit etwa 16 % deutlich höher als in den bei höheren IPA-Anteilen präzipitierten SBP-Fractionen (11 bzw. 4 %). Erhöhte

4.1 Entwicklung von Methoden zur Pektinextraktion aus Zuckerrübenschnitzeln

Proteingehalte in den zuerst ausfällbaren Fraktionen wurden bereits in der Literatur beschrieben (Karnik *et al.* 2016). Durch eine Analyse der Aminosäureverhältnisse nach Hydrolyse und AQC-Derivatisierung konnte jedoch gezeigt werden, dass mit zunehmenden IPA-Anteil auch die Aminosäurezusammensetzung der Proteinfraction variiert (Abbildung 10). Deutlich zu erkennen ist, dass der Anteil der Aminosäure Hydroxyprolin von etwa 3 mol% („20 %“ Fraktion) auf etwa 15 mol% („40 - 70 %“ Fraktion) ansteigt. Dementsprechend handelt es sich bei den Proteinen der zuletzt ausgefällten Fraktion offenbar um hydroxyprolinreiche Proteine bzw. hydroxyprolinreiche Glykoproteine (HRGP). Zur Gruppe der HRGP gehören verschiedene verwandte Strukturproteine, wie Extensine oder AGP (zusammengefasst in Sommer-Knudsen *et al.* 1998). Basierend auf den Ergebnissen der Methylierungsanalyse machen aller Voraussicht nach hochglykosylierte AGP einen beachtlichen Anteil der Proteinfraction in SBP aus. Dass ein erhöhter Anteil an AGP zu besseren Emulgierereigenschaften beiträgt, ist denkbar, kann aber anhand der gezeigten Daten nicht zweifelsfrei belegt werden.

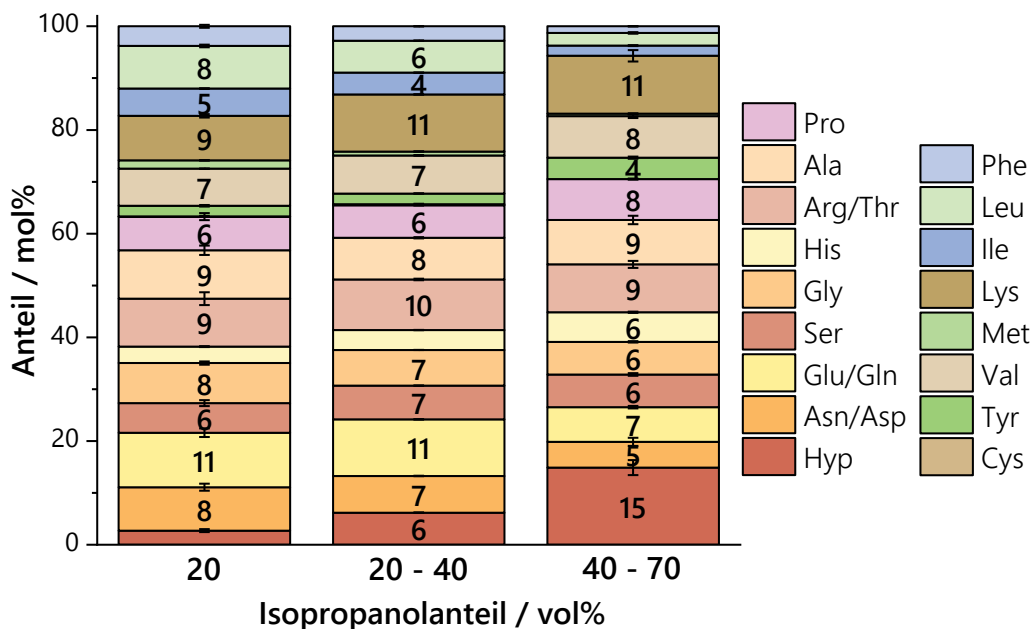


Abbildung 10: Aminosäurezusammensetzungen der Proteinfractionen der stufenweise mit Isopropanol gefällten Pektine, bestimmt nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure und Derivatisierung mit 6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate (AQC, $n = 2$). Die Pektine wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Ala: Alanin, Arg: Arginin, Asn: Asparagin, Asp: Asparaginsäure, Cys: Cystein, Glu: Glutaminsäure, Gln: Glutamin, Gly: Glycin, His: Histidin, Hyp: Hydroxyprolin, Ile: Isoleucin, Leu: Leucin, Lys: Lysin, Met: Methionin, Phe: Phenylalanin, Pro: Prolin, Ser: Serin, Thr: Threonin, Tyr: Tyrosin, Val: Valin

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass eine Abtrennung der zuerst ausfällbaren Fraktionen (IPA-Anteil ≤ 40 %) eine Möglichkeit zur Gewinnung von Pektinen mit höherer Reinheit und verbesserten Eigenschaften ist. Allerdings gehen damit ein zusätzlicher Arbeitsschritt sowie eine deutliche Verringerung der Gesamtausbeute einher. Da dies weder aus industrieller Sicht noch im Hinblick auf weiterführende Versuche zur Funktionalität sinnvoll erscheint, wurden alle Pektine standardmäßig durch Zugabe des 2,2-fachen Volumen des Extrakts an IPA präzipitiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Nach der Fällung des Pektinextrakts wurden die Präzipitate abgetrennt, sukzessive mit IPA:Wasser (70:30) und reinem IPA gewaschen und bei 50 °C im Umluftofen getrocknet.

4.1.2 ENZYMATISCH UNTERSTÜTZTE EXTRAKTIONEN

Pektine können auch durch den Einsatz verschiedener Enzympräparate extrahiert werden, wobei im Regelfall eine Steigerung der Extraktausbeute erzielt werden soll. In dieser Arbeit sollte der Enzymeinsatz möglichst keine Modifizierung der Pektinstruktur bewirken, weshalb ein Cellulase-Präparat (Cellulase ex. *Trichoderma reesei*, Sigma-Aldrich) eingesetzt wurde, welches die Pektinfreisetzung durch den Abbau von Cellulose verbessern sollte. Der Enzymeinsatz wurde mit einer klassischen Säureextraktion (pH 2; 1 h; 80 °C) kombiniert, um insbesondere für milde Extraktionsverfahren erhöhte Ausbeuten realisieren zu können. Der Zeitpunkt der Enzyminkubation spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass eine vor die Extraktion geschaltete Enzyminkubation zu keiner merklichen Ausbeutesteigerung führt (ohne Enzym: 16,6 %, mit Enzym: 17,0 %), während eine nachgeschaltete Inkubation der Extraktionssuspension in einer erheblichen Steigerung der Ausbeute resultierte (25,6 %, Daten nicht gezeigt). Dementsprechend wurden alle weiteren enzymatisch unterstützten Extraktionen mit nachgeschalteter Enzyminkubation durchgeführt. Allerdings wurden beim letztgenannten Ansatz auch die Emulgiereigenschaften negativ beeinträchtigt, was vermutlich auf unerwünschte Nebenaktivitäten zurückzuführen ist. Daher wurden weitere Extraktionen durchgeführt, bei denen geringere Enzymaktivitäten eingesetzt wurden. Die strukturelle Zusammensetzung sowie die Emulgiereigenschaften der auf diese Weise extrahierten Pektine sind in Tabelle 4 dargestellt.

Mit zunehmender Enzymaktivität konnte eine Steigerung der Pektinausbeute beobachtet werden. Im Vergleich zum zuvor beschriebenen Ansatz mit stark erhöhter Enzymaktivität (55 U/g) fiel die Ausbeutesteigerung jedoch etwas geringer aus. Allerdings verschlechterten sich die Emulgiereigenschaften bei den in Tabelle 4 gezeigten Enzymaktivitäten nicht. Auch strukturell konnten keine bedeutenden Unterschiede zwischen den drei SBP festgestellt werden, was auf eine höchstens geringfügige Modifikation der Pektinstruktur durch das eingesetzte Enzym schließen lässt. Auffällig ist lediglich der leichte Anstieg des *trans*-Ferulasäuregehalts und des M_w mit zunehmender Enzymaktivität. Die beobachteten Unterschiede könnten durch die Freisetzung stärker in den Zellwandkomplex eingebetteter Pektine erklärt werden, die ohne teilweisen Abbau der Cellulose nicht erfasst werden. Während die so freigesetzten Pektine offenbar größer sind und einen höheren Substitutionsgrad mit Ferulasäure aufweisen, deutet die Monosaccharidanalyse auf vergleichbare Zusammensetzungen der Polysaccharidfraktionen hin (Abbildung 11). Zudem ist auch kein erhöhter Glucoseanteil feststellbar, sodass die erhöhte Ausbeute nicht auf die vermehrte Koextraktion von Nicht-Pektinpolysacchariden wie Stärke zurückzuführen ist.

4.1 Entwicklung von Methoden zur Pektinextraktion aus Zuckerrübenschnitzeln

Tabelle 4: Pektinausbeuten (n = 2), Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und $x_{90,3}$ -Werte (n = 3) von Zuckerrübenpektinen, die enzymatisch unterstützt (Cellulase ex. *Trichoderma reesei*) extrahiert wurden (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Die Pektine wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) mit anschließender enzymatischer Nachinkubation (50 °C; pH 5,5; 2 h) gewonnen. DAc: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, t-FA: *trans*-Ferulasäuregehalt, M_w : Molekulargewicht (Gewichtsmittel), $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	Enzymaktivität (Cellulase) / U/g		
	0	11	33
Ausbeute / %	16,3 \pm 0,5	20,0 \pm 0,5	22,7 \pm 0,7
$x_{90,3}$ / μ m	0,74 \pm 0,01	0,72 \pm 0,01	0,71 \pm 0,01
M_w / kDa	751 \pm 22	880 \pm 33	911 \pm 27
Proteingehalt / %	3,3 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1
DM / %	69,1 \pm 0,7	70,5 \pm 0,2	61,2 \pm 1,2
DAc / %	47,8 \pm 0,2	52,0 \pm 0,8	46,2 \pm 1,0
t-FA / mg/100 g	688 \pm 1	743 \pm 6	772 \pm 8

Der gewählte Ansatz einer Kombination aus milder Säureextraktion mit nachgeschalteter Enzyminkubation wurde in der Literatur noch nicht zur Pektinextraktion beschrieben. Meist werden rein enzymatische Ansätze gewählt, die jedoch in geringen Ausbeuten resultieren (Wikiera *et al.* 2015; Liew *et al.* 2016). Für SBP konnten von Abou-Elseoud *et al.* (2021) zwar Ausbeuten über 20 % durch rein enzymatische Extraktion erzielt, allerdings waren hierfür stark erhöhte Enzymaktivitäten (200 U Cellulase/g und 200 U Xylanase/g) notwendig. Zudem wiesen die verwendeten Enzympräparate Nebenaktivitäten auf, die sich den hohen Enzymaktivitäten entsprechend stark auf die Struktur der extrahierten SBP auswirkten. So waren die Pektine unter anderem durch einen äußerst geringen Anteil an Neutralzuckern oder *trans*-Ferulasäure gekennzeichnet.

Bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode konnte hingegen gezeigt werden, dass durch die Kombination aus milder Säureextraktion und Enzyminkubation höchstens geringfügige Modifikationen der Pektinstruktur hervorgerufen werden. So konnten unter Anwendung der diskutierten Extraktions- und Inkubationsbedingungen SBP in hoher Ausbeute und mit sehr guten Emulgierereigenschaften gewonnen werden. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch der zusätzliche Arbeits- und Zeitaufwand durch die nachgeschaltete Enzyminkubation. Zudem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es durch die Enzyminkubation auch zu Veränderungen der Molekülstruktur kommt, da es sich nicht um ein rekombinant gewonnenes Enzympräparat handelt. Daher wurden die in dieser Arbeit diskutierten SBP nicht standardmäßig enzymunterstützt extrahiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

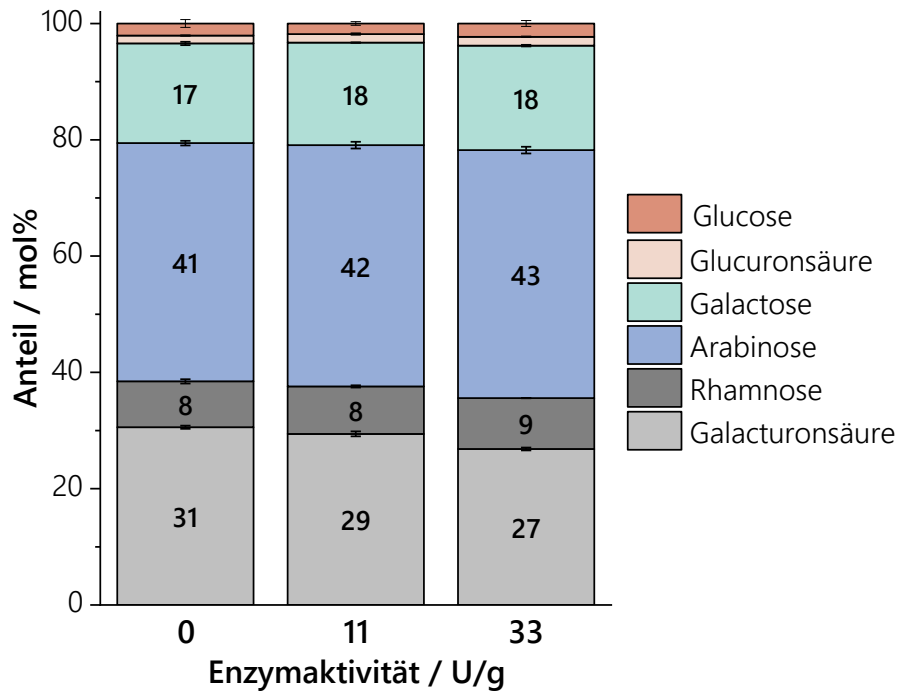


Abbildung 11: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen, die enzymatisch unterstützt (*Cellulase ex. Trichoderma reesei*) extrahiert wurden, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3). Die Pektine wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) mit anschließender enzymatischer Nachinkubation (50 °C; pH 5,5; 2 h) gewonnen

4.1.3 AUTOKLAVENEXTRAKTIONEN

Alternativ zur Extraktion im stark oder schwach sauren Milieu können Pektine auch durch Behandlung im Autoklaven extrahiert werden (Oosterveld *et al.* 1996). Durch den erhöhten Umgebungsdruck kann, im Gegensatz zur klassischen Extraktion bei Normaldruck, das Extraktionsmedium auf Temperaturen über 100 °C erhitzt werden. Höhere Extraktionstemperaturen beschleunigen die Freisetzung von Pektinstrukturen aus dem Zellwandkomplex, sodass kürzere Extraktionszeiten realisierbar sind und auf eine Säurezugabe verzichtet werden kann. Allerdings kann es durch die erhöhte thermische Belastung auch zu Veränderungen der nativen Pektinstruktur kommen, weshalb die Dauer der Extraktion von entscheidender Bedeutung ist. Die in dieser Arbeit durch Autoklavenbehandlung gewonnenen Pektine wurden durchweg bei 121 °C und 2 bar extrahiert. In der Literatur wurden SBP ebenfalls unter diesen Bedingungen durch 40-minütige Autoklavenbehandlung extrahiert (Oosterveld *et al.* 1996; Oosterveld *et al.* 2000a). Als S/L wurde analog zu den Säureextraktionen 1 g/10 mL gewählt, da bei Vorversuchen mit 60-minütiger Autoklavenbehandlung lediglich bei nicht zerkleinerten Zuckerrübenschnitzeln eine leichte Ausbeutesteigerung mit höheren S/L ausgemacht werden konnte (Abbildung 12). Hingegen konnte bei einem S/L von 1/10 durch vorherige Zerkleinerung des Ausgangsmaterials eine deutlich höhere Ausbeute erzielt werden. Im Gegensatz zu den milden Säureextraktionen sind jedoch auch mit nicht zerkleinerten Zuckerrübenschnitzeln hohe Ausbeuten möglich, sodass Autoklavenextraktionen insbesondere in

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

Bezug auf den für die Probenvorbereitung und Extraktion nötigen Zeitaufwand eine vielversprechende Methode zur Extraktion von SBP darstellen könnten.

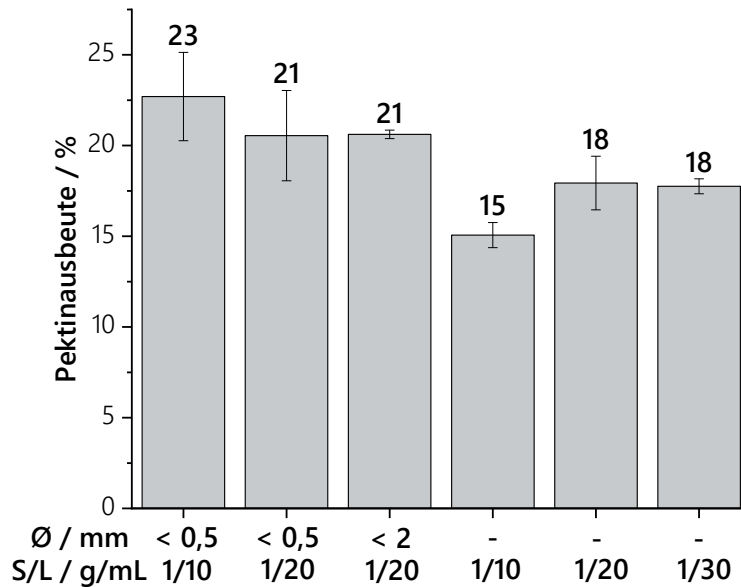


Abbildung 12: Pektinausbeuten verschiedener durch Autoklavenbehandlung (60 min; 121 °C) extrahierter Zuckerrübenpektine. Die Säulenbeschriftung gibt den Mahlgrad des Ausgangsmaterials (Zuckerrübenschnitzel, nicht zerkleinert (-) bzw. auf einen Partikeldurchmesser von < 2 mm bzw. < 0,5 mm zerkleinert) sowie das Feststoff-zu-Flüssigkeits-Verhältnis (S/L) der jeweiligen Extraktion an

Nach der Zugabe von Wasser wurden die Rohstoffsuspensionen für 1 h bei 50 °C im Schüttelinkubator vorbehandelt, um, falls notwendig, durch die Äquilibrierung eine gleichmäßige Anpassung des pH-Werts durch Säurezugabe zu ermöglichen. Diese Vorbehandlung hat keinen merklichen Effekt auf die spätere Autoklavenbehandlung, sodass dieser Schritt zur Zeiteinsparung übergangen werden könnte, falls keine Anpassung des pH-Werts angedacht ist. Gezeigt werden kann dies anhand von 20-minütigen Autoklavenextraktionen (pH 4,6). Selbst bei diesen verkürzten Behandlungszeiten konnten keine Unterschiede zwischen der Ausbeute ohne Vorbehandlung (17,2 %) und mit Vorbehandlung (16,8 %) festgestellt werden. Die sich an die Behandlung im Autoklaven anschließende Aufarbeitung (Extraktabtrennung, Präzipitation, Aufreinigung, Trocknung) war deckungsgleich zur bereits beschriebenen Aufarbeitung bei säureextrahierten Pektinen.

4.2 ABHÄNGIGKEIT VERSCHIEDENER PARAMETER VON DEN EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN

Ziel der durchgeführten Extraktionen war es, durch Variation verschiedener Prozessparameter wie dem pH-Wert oder der Extraktionsdauer eine Bandbreite an strukturell verschiedenen SBP zu erhalten, die sich dementsprechend auch in ihren Emulgierereigenschaften unterscheiden. In den folgenden Unterkapiteln werden anhand ausgewählter Extraktionen die Zusammenhänge

zwischen den Prozessbedingungen und der daraus resultierenden Pektinausbeute, der Molekülstruktur und den Emulgierereigenschaften dargelegt.

4.2.1 ABHÄNGIGKEIT DER PEKTINAUSBEUTE VON DEN EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN

Bei der Extraktion von Pektinen ist, neben der strukturellen Zusammensetzung und den daraus resultierenden funktionellen Eigenschaften, die erzielte Ausbeute ein wesentlicher Aspekt. Die Ausbeute ist, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, einerseits von der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials abhängig, andererseits aber auch von den Extraktionsbedingungen.

SÄUREEXTRAKTION. Die entscheidenden Parameter für die Pektinausbeute sind die Dauer der Extraktion sowie der pH-Wert des Extraktionsmediums. Bisher veröffentlichte Studien beschränkten sich meist auf kleinere Parameterbereiche, beispielsweise auf pH-Werte von 1,5 und 2 und Extraktionszeiten von 1 oder 4 h (Yapo *et al.* 2007a; Sun und Hughes 1998). In dieser Arbeit wurde mit pH-Werten von 2, 3, 4 und 6 und Extraktionszeiten von 1, 2, 4 und 16 h eine deutlich breitere Spanne dieser Extraktionsparameter abgedeckt. Dementsprechend werden strukturell vielfältigere Pektine gewonnen und es können umfassendere Aussagen über die Auswirkungen unterschiedlicher Säureextraktionen auf SBP getätigt werden.

Die Dauer der thermischen Behandlung hat in Abhängigkeit vom pH-Wert einen starken Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Bei den untersuchten pH-Werten wurden tendenziell mit zunehmender Extraktionsdauer erhöhte Ausbeuten erzielt (Abbildung 13). Allerdings gibt es, abhängig vom pH-Wert, große Unterschiede in der absoluten Ausbeute. Bei einem pH-Wert von 2 können bereits ab 1 h Extraktionszeit hohe Ausbeuten erzielt werden. Bei den höheren pH-Werten sind die beobachteten Ausbeuten bei kurzen Zeiten vergleichsweise gering und nähern sich erst mit zunehmender Extraktionsdauer den Werten der Extraktionen bei pH 2 an. Die erhöhte Ausbeute bei pH 2 könnte durch eine verbesserte Freisetzung der Pektinstrukturen aus dem Zellwandkomplex in Folge einer partiellen Hydrolyse bestimmter Pektinmotive oder von Matrixbestandteilen, die Pektinstrukturen einschließen oder assoziiert mit ihnen vorliegen, erklärt werden. Extraktionen bei pH 6 weisen ein von den klassischen Säureextraktionen abweichendes Muster auf. Bei Erhöhung der Extraktionszeit von 4 h auf 16 h kann keine weitere Ausbeutesteigerung mehr festgestellt werden, da nach 16 h kein polymeres Material mehr ausgefällt werden konnte. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass es durch die thermische Behandlung (80 °C) bei einem vergleichsweise hohen pH-Wert verstärkt zu β -Eliminierungsreaktionen und damit zu einer fortschreitenden Spaltung des Galacturonanrückgrats kommt (Albersheim 1959). Die polymeren Strukturen werden demnach in zunehmend kleinere Bruchstücke gespalten, die offensichtlich ab einer gewissen Größe durch die gewählten Präzipitationsbedingungen nicht mehr gefällt und damit nicht erfasst werden. Für Pektine wurde diese Hypothese noch nicht systematisch untersucht. Xu *et al.* (2014) konnten jedoch schon für andere Polysaccharide zeigen, dass die Größe des Oligomers bzw. Polymers in Abhängigkeit vom Anteil an organischem Fällungsmittel entscheidenden Einfluss auf die

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

Ausfällbarkeit hat. Bei einer Ethanolkonzentration von 70 % wurden beispielsweise 65 % eines 50 kDa Dextrans, 45 % eines 5 kDa Dextrans und 5 % eines 1 kDa Dextrans präzipitiert. Allerdings sind die Fällungseigenschaften ungemein von der Art des Polymers abhängig, was beispielhaft daran gezeigt werden kann, dass unter identischen Bedingungen ein 50 kDa Pullulan vollständig gefällt werden konnte (Xu *et al.* 2014). Dementsprechend sind die Ergebnisse nur bedingt auf Pektine übertragbar, insbesondere unter Berücksichtigung der äußerst heterogenen strukturellen Zusammensetzung von SBP.

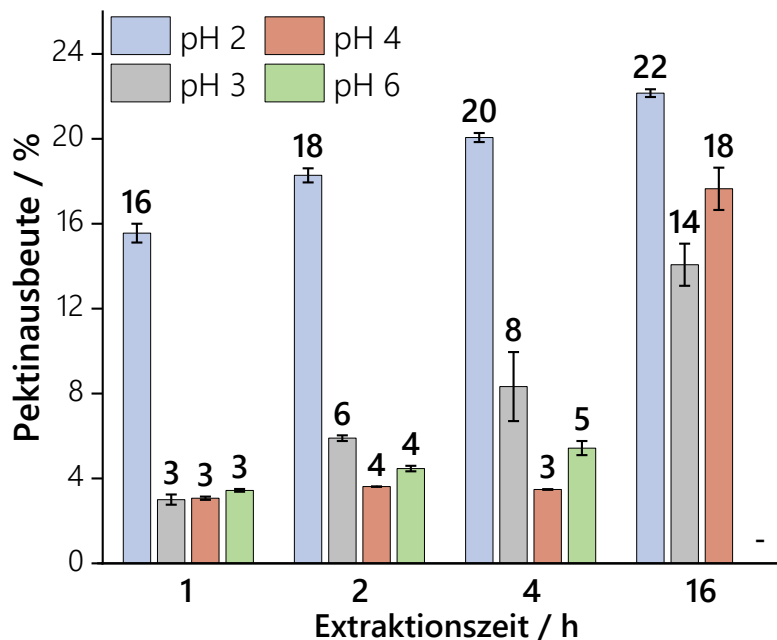


Abbildung 13: Pektinausbeute bei Anwendung unterschiedlicher Extraktionsbedingungen. Die Pektine wurden bei unterschiedlichen pH-Werten von pH 2 (blau), pH 3 (grau), pH 4 (orange) und pH 6 (grün) mit variierenden Extraktionszeiten ($t = 1, 2, 4$ und 16 h) aus gemahlene Zuckerrübenschnitzeln ($n = 2$) extrahiert

AUTOKLAVENEXTRAKTION. Die Auswirkungen unterschiedlich langer Autoklavenbehandlungen (pH 4,6; 121 °C; 2 bar) auf die erzielte Ausbeute können anhand von SBP abgebildet werden, die für 20, 40 bzw. 60 min extrahiert wurden. Ähnlich wie bei säureextrahiertem SBP konnte eine Ausbeutesteigerung mit zunehmender Extraktionszeit beobachtet werden. Die Steigerung fällt jedoch vergleichsweise gering aus, da nach 20 min mit etwa 17 % bereits eine hohe Ausbeute erzielt wurde. Mittels Autoklavenextraktionen können bei Zuckerrübenschnitzeln somit ohne aufwändige Probenvorbereitung innerhalb von kurzer Zeit hohe Pektinausbeuten realisiert werden. Während eine Verlängerung der Extraktionszeit auf 40 min noch in einer moderaten Steigerung der Ausbeute resultierte (ca. 22 %), führte eine Prolongation auf 60 min zu keiner weiteren Erhöhung (ca. 23 %). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Pektinausbeute durch abermals verlängerte Extraktionszeiten nicht weiter gesteigert werden kann, da die unter den beschriebenen Bedingungen zugänglichen Pektinstrukturen nach 40 min vermutlich weitestgehend extrahiert wurden. In der Literatur wurde für eine 40-minütige Autoklavenextraktion eine Ausbeute von etwa 12 % berichtet (Oosterveld *et al.* 1996). In dieser

4 Ergebnisse und Diskussion

Studie wurde das Ausgangsmaterial jedoch zuvor zweifach bei 40 °C extrahiert (Ausbeute ~8%), sodass zusammengenommen eine vergleichbare Ausbeute erzielt wurde (20 % zu 22 %).

Neben der Änderung der Behandlungsdauer kann die Extraktion auch durch die Anpassung des pH-Werts beeinflusst werden. Um den Einfluss einer pH-Wert Absenkung auf die Ausbeute zu überprüfen, wurden auch 20-minütige Autoklavenextraktionen bei pH 3,5 bzw. 2,5 durchgeführt. Bei dem Extrakt, dessen pH-Wert vor der Autoklavenbehandlung auf 3,5 abgesenkt wurde, wurde eine leicht erhöhte Ausbeute festgestellt (ca. 19 %). Bei weiterer pH-Absenkung auf 2,5 konnte hingegen keine Ausbeutesteigerung beobachtet werden (ca. 17 %). Die im Vergleich zur Extraktion bei pH 4,6 nicht gesteigerte Ausbeute lässt vermuten, dass eine Autoklavenbehandlung bei pH 2,5 durch die harschen Bedingungen bereits bei kurzen Extraktionszeiten zu Abbaureaktionen in der Pektinfraktion führt.

4.2.2 ABHÄNGIGKEIT DER PEKTINSTRUKTUR VON DEN EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN

Die Struktur von Pektinen hängt, ebenso wie die Ausbeute, stark von den Bedingungen ab, unter denen sie aus pflanzlichen Rohstoffen extrahiert wurden. In diesem Abschnitt werden die durch Variation der Extraktionsdauer und des pH-Werts hervorgerufenen Veränderungen in der molekularen Struktur anhand von mehreren Beispielen dargestellt. Zum einen wird dies an SBP gezeigt, die bei 80 °C und einem pH von 2 bzw. 3 für jeweils 1, 2, 4 oder 16 h extrahiert wurden. Zum anderen werden auch drei Pektine diskutiert, die unter Zusatz des Komplexbildners Citronensäure für 16 h bei 80 °C und pH 2, 3 bzw. 4 extrahiert wurden. Zusätzlich erfolgt auch eine Erörterung der strukturellen Merkmale autoklavenextrahierter Pektine, die ohne Anpassung des pH-Werts bei 121 °C für 20, 40 oder 60 min bzw. mit Anpassung auf pH 2,5 oder 3,5 für 20 min behandelt wurden. Anhand der ausgewählten Proben kann die pH- und Zeitabhängigkeit der Pektinstruktur bei unterschiedlichen Extraktionsmethoden aufgezeigt werden.

Im Folgenden werden die Auswirkungen der unterschiedlichen Extraktionsbedingungen auf verschiedene relevante Strukturparameter diskutiert. Für eine zusammenfassende Darstellung der bei den verschiedenen Extraktionsmethoden erzielten Pektinausbeuten sowie der Struktur- und Emulgiereigenschaftsparameter der entsprechenden Pektine wird auf den Anhang verwiesen (Säureextraktionen: Tabelle 25, Citronensäureextraktionen: Tabelle 26, Autoklavenextraktionen: Tabelle 27).

4.2.2.1 MOLEKULARGEWICHT

Das M_w ist ein wichtiger Parameter bei der Strukturcharakterisierung von Polymeren. Im Zuge des Extraktionsprozesses kann es durch chemische und physikalische Einwirkungen zu Veränderungen innerhalb der Molekülstruktur kommen, die sich in einem modifizierten M_w widerspiegeln. In der Polysaccharidfraktion von Pektinen kann es sowohl zu Spaltungen im Rückgrat als auch in den neutralen Seitenketten kommen. Während die glykosidischen Bindungen

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

der Arabinane und (Arabino-) Galactane säurehydrolytisch gespalten werden können, erfolgt eine mögliche Spaltung des (Rhamno-)Galacturonanrückgrats entweder bei stark sauren Bedingungen oder anhand eines β -Eliminierungsmechanismus, der durch erhöhte pH-Werte (> 4) begünstigt wird (Albersheim 1959; Albersheim *et al.* 1960). Die Auswirkungen auf das M_w sind bei der Abspaltung endständiger Monosaccharide oder kleinerer Oligosaccharide gering. Spaltungen innerhalb längerer Abschnitte oder von Ketten, die verschiedene Pektinmotive miteinander verknüpfen, können hingegen bedeutende Auswirkungen auf das M_w des untersuchten Extrakts haben. Neben der Spaltung glykosidischer Bindungen können auch, in Abhängigkeit von den Prozessbedingungen, Veränderungen der Proteinstruktur oder Entesterungsreaktionen auftreten und das M_w beeinflussen.

Für die untersuchten SBP konnte eine deutliche Abhängigkeit des M_w von den Extraktionsbedingungen festgestellt werden (Tabelle 5). Mit zunehmender Extraktionszeit nimmt beispielsweise das M_w von SBP, die bei pH 2 extrahiert wurden, sukzessive von etwa 910 kDa nach 1 h auf 290 kDa nach 16 h ab, was auf eine partielle Hydrolyse der neutralen Seitenketten hindeutet. Ein fortschreitender Abbau des Polymers kann auch anhand der SEC-Elutionsprofile der entsprechenden SBP veranschaulicht werden, die eine sukzessive Abnahme der höhermolekularen Fraktionen anzeigen (Abbildung 38). Bei höheren pH-Werten ist der gegenteilige Trend erkennbar, sodass bei pH 3 eine zunehmende Extraktionsdauer mit einem Anstieg des M_w einhergeht. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass durch die vergleichsweise milden Bedingungen in den ersten Stunden der Extraktion nur leicht zugängliche, tendenziell kleinere Pektine extrahiert werden. Mit zunehmender Extraktionszeit werden zusätzlich tieferliegende, stärker in den Zellwandkomplex eingebettete Pektine freigesetzt. Diese Hypothese wird durch die zu Beginn sehr niedrigen Extraktausbeuten gestützt, die mit steigender Extraktionszeit stark zunehmen (Abbildung 13).

Die Abhängigkeit des M_w vom pH-Wert des Extraktionsmediums kann anhand der unter Citronensäurezusatz für 16 h bei pH 2, 3 bzw. 4 extrahierten Pektine veranschaulicht werden (Tabelle 5). Bei pH 2 sind nach 16 h nur noch etwa 150 kDa als M_w feststellbar, während das M_w bei dem bei pH 4 extrahierten Pektin noch 420 kDa beträgt. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für die durch 20-minütige Autoklavenextraktion bei unterschiedlichen pH-Werten gewonnenen SBP. Das bei pH 2,5 extrahierte Pektin weist mit etwa 170 kDa ein deutlich geringeres M_w auf als die bei pH 3,5 bzw. pH 4,6 extrahierten Pektine (jeweils etwa 270 kDa). Allerdings konnte bei pH 4,6 bei prolongierten Behandlungsdauern im Autoklaven eine drastische Reduktion des M_w festgestellt werden. Mit etwa 200 kDa ($t = 40$ min) und 100 kDa ($t = 60$ min) deuten die ermittelten Werte auf verstärkt ablaufende β -Eliminierungsreaktionen im Galacturonanrückgrat hin. Die SEC-Elutionsprofile bestätigen die sukzessive Abnahme größerer Fraktionen und verdeutlichen die im Vergleich zu den bei pH 2 säureextrahierten SBP (s. Anhang, Abbildung 38) deutlich geringe mittlere Polymergröße (s. Anhang, Abbildung 39).

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Molekulargewichte (Gewichtsmittel, M_w) (kDa \pm Standardabweichung) von Zuckerrübenpektinen, die durch unterschiedliche Bedingungen extrahiert wurden, bestimmt mittels Größenausschlusschromatographie mit Brechungsindex- und Mehrwinkellichtstreuung (SEC-RI/MALS, $n = 3$). Die angegebenen Zeiten und pH-Werte geben die entsprechenden Extraktionsbedingungen an

Säureextraktion	M_w / kDa		
	pH 2	pH 3	
1 h	913 \pm 19	154 \pm 13	
2 h	824 \pm 62	196 \pm 38	
4 h	695 \pm 51	388 \pm 30	
16 h	285 \pm 20	505 \pm 17	
Citronensäureextraktion	pH 2	pH 3	pH 4
16 h	154 \pm 19	223 \pm 8	419 \pm 12
Autoklavenextraktion	pH 2,5	pH 3,5	pH 4,6
20 min	165 \pm 3	272 \pm 14	272 \pm 22
40 min	-	-	196 \pm 20
60 min	-	-	103 \pm 9

4.2.2.2 MONOSACCHARIDZUSAMMENSETZUNG

Der Polysaccharidanteil der extrahierten SBP wurde hinsichtlich der Monosaccharidzusammensetzung untersucht, um Rückschlüsse auf den Aufbau des Polysaccharids zu ziehen. Abhängig von den Extraktionsbedingungen können die Anteile der vier Hauptmonomere Arabinose, Galactose, Rhamnose und Galacturonsäure stark variieren. Arabinose dominiert bei milden Extraktionsbedingungen die Monosaccharidverteilung von SBP (bis zu 57 mol%, Abbildung 14, rechts). Bei härteren Prozessbedingungen (geringerem pH-Wert, längeren Extraktionszeiten) wurden hingegen deutlich geringere Arabinoseanteile beobachtet (bis zu 6 mol%, Abbildung 14, links).

Für SBP konnte gezeigt werden, dass die Monosaccharidzusammensetzung eine starke Abhängigkeit sowohl von der Extraktionszeit als auch vom pH-Wert aufweist. Anhand der Monosaccharidverteilungen der jeweils für 1, 2, 4 bzw. 16 h bei pH 2 und pH 3 extrahierten Pektine kann neben der pH- auch die Zeitabhängigkeit der Monosaccharidzusammensetzung dargestellt werden. Bei beiden pH-Werten nimmt der Arabinoseanteil mit zunehmender Extraktionszeit ab, wobei der Effekt bei pH 2 stärker ausgeprägt ist als bei pH 3. Beim niedrigeren pH-Wert ist zudem eine geringere Zunahme bzw. eine leichte Abnahme des Galactoseanteils bei verlängerten Extraktionszeiten ersichtlich. Die Kombination aus sinkendem M_w , steigender Ausbeute und dem

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

sukzessive geringeren Arabinoseanteil in der Monosaccharidzusammensetzung deutet darauf hin, dass insbesondere Arabinane und arabinosehaltige Seitenketten mit fortschreitender Extraktionszeit abgebaut werden. Galactane werden hingegen offenbar erst bei längerer Säure- und Hitzeeinwirkung angegriffen. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen bereits veröffentlichter Studien, bei denen SBP durch Säureextraktion gewonnen wurden, und kann auf die unterschiedliche Säurelabilität der glykosidischen Bindungen zurückgeführt werden (BeMiller 1967; Levigne *et al.* 2002a). Die in Pektinen vorliegenden Arabinanstrukturen sind überwiegend aus α -verknüpften Arabinofuranoseeinheiten aufgebaut, deren Verknüpfungen säurelabiler als die Bindungen zwischen den Monomeren pektischer Galactane sind, die als β -verknüpfte Pyranoseeinheiten vorliegen.

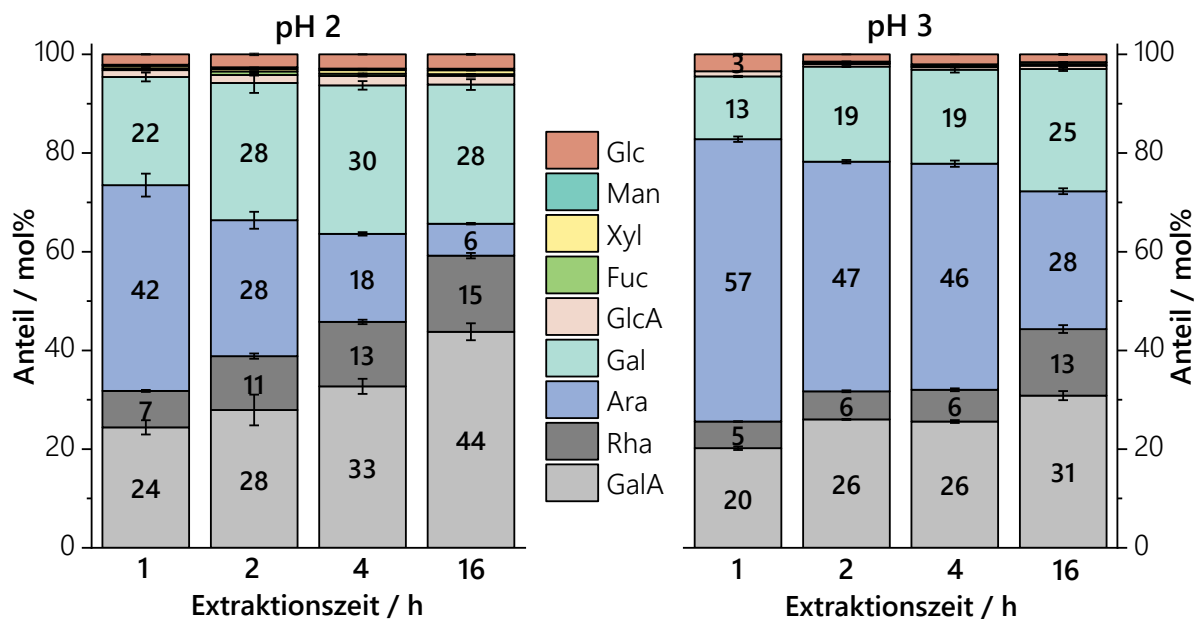


Abbildung 14: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen, die bei pH-Werten von 2 (links) bzw. 3 (rechts) für 1, 2, 4 bzw. 16 h extrahiert wurden, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3). Die Extraktionen erfolgten bei 80 °C. Ara: Arabinose, Fuc: Fucose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, GlcA: Glucuronsäure, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

Die pH-Abhängigkeit der Monosaccharidverteilung kann anhand der Pektine verdeutlicht werden, die bei pH 2, 3 bzw. 4 und mit einer Extraktionszeit von 16 h gewonnen wurden (Abbildung 15). Bei dem bei pH 4 extrahierten Pektin wird die Verteilung von Arabinose dominiert (48 mol%) und ähnelt insgesamt der Monosaccharidzusammensetzung eines SBP, das für 1 h bei pH 2 extrahiert wurde (42 mol%, Abbildung 14). Dementsprechend deutet die Monosaccharidzusammensetzung darauf hin, dass Extraktionen bei pH 4 selbst nach 16 h zu keiner gravierenden Veränderung in der Polysaccharidzusammensetzung von SBP führen. Bei pH 3 ist hingegen eine Reduzierung des Arabinoseanteils (28 mol%) sowie eine entsprechende Zunahme der Anteile an Galactose, Rhamnose und Galacturonsäure zu sehen. Dieser Trend setzt sich bei dem bei pH 2 extrahierten Pektin fort: Arabinose macht mit 8 mol% den geringsten Anteil der vier Hauptmonosaccharide an der Verteilung dieses SBP aus. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der

4 Ergebnisse und Diskussion

pH-Wert des Extraktionsmediums einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur des extrahierten Polysaccharids hat. Vermutlich werden Arabinane und in geringerem Maße auch (Arabino-) Galactane durch die Temperatur- und Säureeinwirkung angegriffen und sukzessive abgebaut. Bei pH 2 ist dieser Effekt bereits bei kurzen Extraktionszeiten zu beobachten, während der Arabinanabbau bei pH 3 deutlich verlangsamt abläuft. Die bei pH 4 extrahierten Pektine weisen hingegen selbst nach 16 h Extraktionszeit noch eine Monosaccharidzusammensetzung auf, die lediglich auf geringfügige Veränderungen der ursprünglichen Seitenkettenstruktur hindeuten.

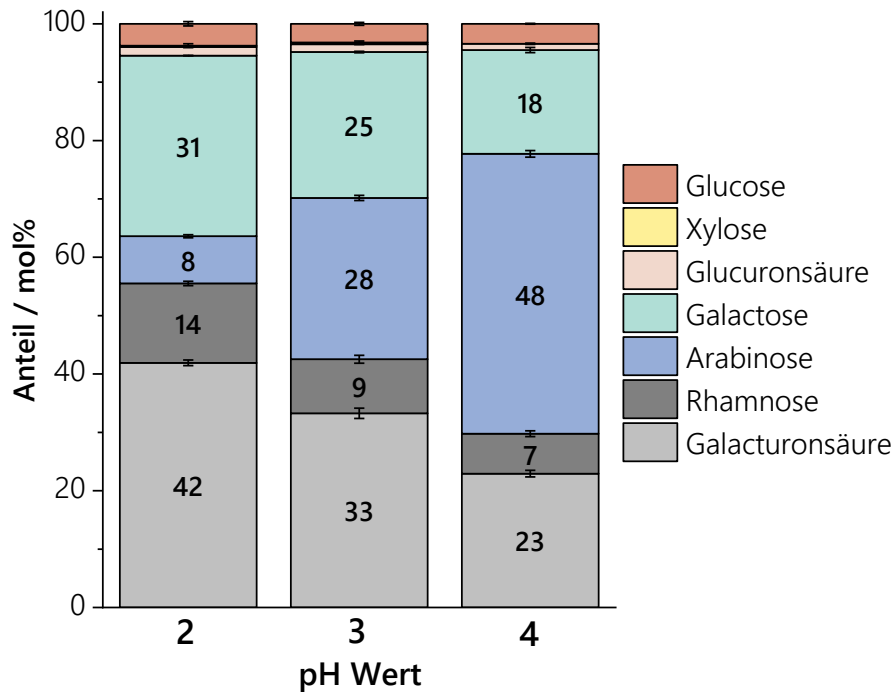


Abbildung 15: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen, die bei pH 2, 3 bzw. 4 für 16 h extrahiert wurden, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3). Die Extraktionen erfolgten bei 80 °C unter Zusatz von 100 mM Citronensäure

Die pH-Abhängigkeit der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharidfraktion kann auch bei den durch Autoklavenbehandlung extrahierten Pektinen beobachtet werden. In Abbildung 16 sind die Verteilungen der bei unterschiedlichen pH-Werten bei 121 °C und 2 bar für 20 min behandelten Proben dargestellt. Die Monosaccharidzusammensetzungen weisen auf denselben Trend hin, der auch bei den klassisch säureextrahierten Pektinen beobachtet wurde. Mit zunehmender Säurekonzentration verringert sich der Anteil an Arabinose, wobei die Abnahme im Vergleich zu den für 16 h (80 °C) bei pH 2, 3 und 4 extrahierten SBP (Abbildung 15) geringer ausfällt. Unter Berücksichtigung der leicht erhöhten pH-Werte der 20-minütigen Autoklavenextraktion (2,5; 3,5 und 4,6), kann gemutmaßt werden, dass 16-stündige Extraktionen bei 80 °C und pH 2 ähnliche Auswirkungen auf die Monosaccharidzusammensetzung pektischer Polysaccharide haben wie 20-minütige Autoklavenextraktionen bei 121 °C und pH 2,5.

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

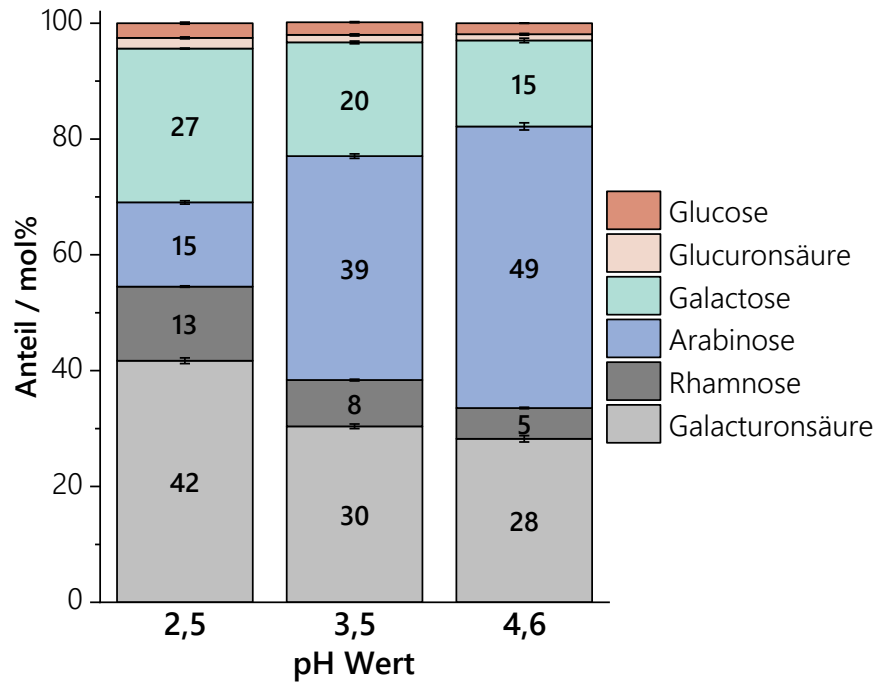


Abbildung 16: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen, die durch 20-minütige Autoklavenbehandlung bei 121 °C und pH 2,5, 3,5 bzw. 4,6 extrahiert wurden, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3)

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden zusätzlich die Monosaccharidzusammensetzungen der durch unterschiedlich lange Autoklavenbehandlung bei pH 4,6 gewonnenen SBP analysiert. Wie in Abbildung 17 dargestellt, unterscheiden sich die Verteilungen nur geringfügig und sind insbesondere durch hohe Arabinoseanteile gekennzeichnet (42 - 49 mol%). Mit zunehmender Extraktionsdauer ist eine leichte Abnahme des Arabinoseanteils zu beobachten, die auf eine geringfügige Modifikation der Arabinanfraktion im Zuge der Autoklavenextraktion hindeutet.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass die Monosaccharidzusammensetzung von SBP maßgeblich durch den im Zuge der Extraktion eingestellten pH-Wert bestimmt wird. Die Extraktionstemperatur und Extraktionsdauer beeinflussen die anteilige Zusammensetzung der Monosaccharide hingegen nur bei hohen Säurekonzentrationen, wobei die Behandlung bei niedrigen pH-Werten insbesondere in einer drastischen Reduzierung des Arabinoseanteils resultiert. Hohe Ausbeuten von SBP mit arabinosedominierten Monosaccharidzusammensetzungen können mittels Säureextraktion bei 80 °C sowohl durch kurze Extraktionszeiten bei niedrigen pH-Werten (2,0) als auch durch lange Extraktionszeiten bei höheren pH-Werten (4,0) erreicht werden. Bei Autoklavenextraktionen (121 °C) zeichnet sich ein vergleichbares Muster ab; ohne Säurezugabe (pH 4,6) weisen SBP unabhängig von der Behandlungsdauer hohe Arabinoseanteile auf. Außergewöhnlich hohe Arabinosegehalte wurden zwar bereits für einzelne autoklavenextrahierte SBP-Fractionen beschrieben (Oosterveld *et al.* 1996; Oosterveld *et al.* 2000a), nicht jedoch für SBP, die unter Säurezugabe extrahiert wurden. Zudem wurden für die Untersuchung von Struktur-Eigenschaftszusammenhängen bisher fast ausschließlich Pektine mit niedrigen Anteilen an Arabinose analysiert. Beispielsweise extrahierten und analysierten Yapo *et*

4 Ergebnisse und Diskussion

al. (2007a) SBP mit Arabinosegehalten von 3 - 12 % (w/w), während andere Forschungsgruppen ihre Studien ausgehend von kommerziellen SBP mit 9 % (w/w) Arabinose (Chen *et al.* 2016a) bzw. 7 % (w/w) Arabinose (Funami *et al.* 2011) konzipierten.

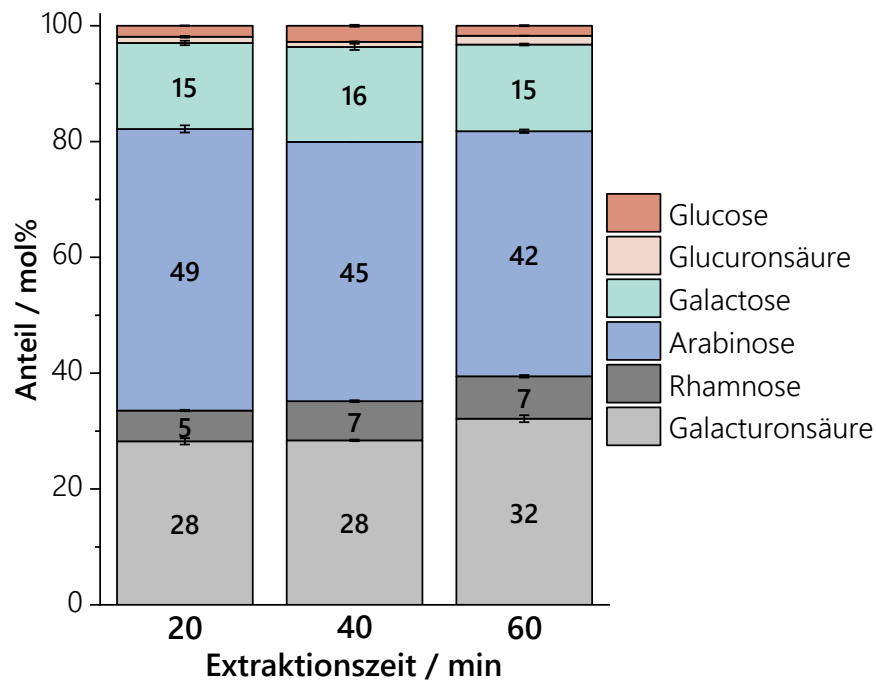


Abbildung 17: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen, die ohne pH-Wert Anpassung (pH 4,6) durch unterschiedlich lange Autoklavenbehandlung bei 121 °C extrahiert wurden, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3)

4.2.2.3 GLYKOSIDISCHE BINDUNGSVERHÄLTNISSE

Zur näheren Charakterisierung der Polysaccharidfraktionen wurden die glykosidischen Bindungsverhältnisse ausgewählter Pektine mittels Methylierungsanalyse bestimmt. In Tabelle 6 sind auszugsweise die Verhältnisse der glykosidischen Bindungstypen der für 1, 2, 4 bzw. 16 h bei pH 2 extrahierten Pektine dargestellt. Für die vollständigen Ergebnisse wird auf den Anhang verwiesen (Tabelle 29). Unter den mildesten Extraktionsbedingungen (t = 1 h) sind terminale, 1,5- und 1,3,5-verknüpfte Arabinoseeinheiten die dominierenden Bindungstypen der Neutralzuckerfraktion. Neben dem relativ hohen Verhältnis von 1,3,5- zu 1,5-verknüpften Arabinoseeinheiten lassen auch die Anteile an 1,2,5- und 1,2,3,5-verknüpften Arabinoseeinheiten darauf schließen, dass (hoch-) verzweigte Arabinane die quantitativ bedeutendsten Struktur motive nativer bzw. nur geringfügig modifizierter Zuckerrübenpektine darstellen. Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenfalls von Guillon und Thibault (1989) für mild säureextrahierte SBP beobachtet. Bei fortschreitender thermischer Beanspruchung nimmt der Anteil an Arabinanstrukturen deutlich ab. Der Anteil verzweigter Arabinosen geht dabei stärker zurück als der Anteil linearer Strukturen. So konnten nach 16 h Extraktionszeit nur noch jeweils < 1 mol% 1,3,5-, 1,2,5- und 1,2,3,5-verknüpfte Arabinose bestimmt werden, während terminale, 1,3- und 1,5-verknüpfte Arabinoseeinheiten jeweils noch etwa 5 mol% der Verteilung ausmachten.

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

Tabelle 6: Anteile der glykosidischen Bindungen (mol%) von Zuckerrübenpektinen, die bei pH 2 für 1, 2, 4 bzw. 16 h extrahiert wurden, bestimmt mittels Methylierungsanalyse (n = 2). Auszugsweise Darstellung der Arabinose-, Galactose- und Rhamnosebindungstypen. Für die vollständige Tabelle (inkl. Range/2) wird auf den Anhang verwiesen (Tabelle 29). Die Anteile sind bezogen auf die Gesamtheit aller Bindungstypen (%Ges) sowie auf den Anteil am jeweiligen Monosaccharid (%Ara, %Gal, %Rha) dargestellt. Ara: Arabinose, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, t: terminal, Xyl: Xylose

Glykosidische Bindungstypen		pH 2, 80 °C							
		1 h		2 h		4 h		16 h	
		%Ges	%Ara	%Ges	%Ara	%Ges	%Ara	%Ges	%Ara
Arabinose	t-Araf	30,3	38,8	24,5	40,0	18,5	37,8	5,9	30,7
	t-Arap	0,5	0,6	0,7	1,1	0,6	1,2	1,2	6,3
	1,2-Araf	0,9	1,2	1,0	1,6	1,4	2,9	0,7	3,6
	1,3-Araf	1,7	2,2	2,6	4,2	2,6	5,3	4,9	25,5
	1,5-Araf	22,6	29,0	17,5	28,6	14,4	29,4	5,2	27,1
	1,3,5-Araf	16,4	21,0	10,5	17,2	6,1	12,5	0,7	3,6
	1,2,5-Araf	1,8	2,3	2,0	3,3	2,0	4,1	0,5	2,6
	1,2,3,5-Araf	3,8	4,9	2,4	3,9	3,3	6,7	0,1	0,5
	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	
Galactose	t-Galp	3,4	24,5	6,5	28,3	7,8	27,2	16,8	33,0
	1,3-Galp	1,5	10,8	2,0	8,7	2,5	8,7	2,1	4,1
	1,4-Galp	4,1	29,5	7,3	31,7	9,2	32,1	15,2	29,9
	1,6-Galp	2,4	17,3	4,2	18,3	5,4	18,8	13,3	26,1
	1,2,4-Galp	0,2	1,4	0,1	0,4	0,3	1,0	0,2	0,4
	1,3,4-Galp	0,3	2,2	0,5	2,2	0,6	2,1	0,4	0,8
	1,3,6-Galp	2,0	14,4	2,4	10,4	2,9	10,1	2,9	5,7
	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	
Rhamnose	1,2-Rhap	1,9	47,5	4,6	56,1	4,2	50,0	12,8	60,7
	1,2,4-Rhap	2,1	52,5	3,6	43,9	4,2	50,0	8,3	39,3

Das Vorhandensein von sowohl 1,4- als auch 1,3- und 1,6- verknüpften Galactoseeinheiten zeigt an, dass in den untersuchten SBP sowohl AG-I als auch AG-II vorliegen. Während die glykosidischen Bindungsverhältnisse bei allen untersuchten SBP einen vergleichbaren, relativ linearen Aufbau der AG-I-Fractionen anzeigen, deuten die hohen Anteile an 1,6- und 1,3,6- verknüpften Galactoseeinheiten auf einen hochverzweigten Aufbau der AG-II-Fractionen hin. Mit zunehmender Extraktionszeit nehmen die relativen Anteile an 1,3- und 1,3,6- verknüpften Galactoseeinheiten ab, was auf eine Verkürzung der mittleren Kettenlänge des AG-II-Rückgrats zurückzuführen sein könnte. Das Verhältnis von 1,3- zu 1,3,6- verknüpften Galactoseeinheiten ist jedoch bei den vier untersuchten SBP vergleichbar, weshalb von einem ähnlichen Verzweigungsgrad des AG-II-Rückgrats auszugehen ist. Allerdings nimmt der Anteil an 1,6- verknüpften Galactoseeinheiten mit zunehmender Extraktionszeit zu, was auf längere AG-II-Seitenketten dieser Pektine schließen lässt und mit einer höheren Stabilität von 1,6- verknüpften Galactoseeinheiten erklärt werden könnte. Da die Ausbeute mit zunehmender Extraktionszeit

4 Ergebnisse und Diskussion

steigt, wäre es jedoch auch denkbar, dass die Unterschiede teilweise darauf zurückzuführen sind, dass bei verlängerten Extraktionszeiten strukturell unterschiedliche Pektinfraktionen (z.B. mit einem höheren Anteil an 1,6-verknüpften Galactoseseitenketten) aus dem Ausgangsmaterial extrahiert werden.

Eine komplexe, stark verzweigte Struktur der untersuchten Pektine wird auch durch den hohen Substitutionsgrad des RG-Rückgrats bestätigt. Aus den Verhältnissen der Anteile von 1,2- und 1,2,4-verknüpfter Rhamnose ergibt sich für die Rhamnoseeinheiten ein durchgehend hoher Substitutionsgrad von etwa 40 - 55 %, wobei keine eindeutige Abhängigkeit von der Extraktionszeit gegeben ist. Demzufolge reduziert sich auch nach extensiver thermischer und azider Behandlung die Zahl der Seitenketten nur bedingt. Die Änderungen der Bindungsverhältnisse in den Arabinan- und Galactanstrukturen sind somit auf eine Verringerung der Länge bzw. des Verzweigungsgrads der neutralen Pektinseitenketten zurückzuführen.

Der Einfluss einer Autoklavenbehandlung auf die glykosidischen Bindungsverhältnisse der Neutralzuckerfraktionen von SBP wurde ebenfalls untersucht. In Tabelle 7 sind auszugsweise die Anteile der Arabinose-, Galactose- und Rhamnosebindungstypen eines 20- bzw. 60-minütigen Autoklavenpektins einem mild säureextrahierten SBP (1 h; pH 2; 80 °C) gegenübergestellt. Die vollständigen Ergebnisse der Methylierungsanalyse dieser Proben sind in Tabelle 30 im Anhang dargestellt. Sowohl in den relativen als auch in den absoluten Anteilen ähneln sich die Arabinose-, Galactose- und Rhamnoseverhältnisse der drei dargestellten Pektine. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch schon von Oosterveld *et al.* (2000a) für 40-minütige Autoklavenextraktionen erzielt werden. Demnach unterscheiden sich SBP unabhängig von der Extraktionstemperatur und -dauer nicht grundlegend im Aufbau der neutralen Seitenketten, vorausgesetzt die Säurelast im Zuge der Extraktion ist nicht zu hoch.

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

Tabelle 7: Anteile der glykosidischen Bindungen (mol%) von Zuckerrübenpektinen, die durch 60-minütige Säureextraktion (pH 2; 80 °C) oder 20- bzw. 60-minütige Autoklavenbehandlung (pH 4,6; 121 °C) extrahiert wurden, bestimmt mittels Methylierungsanalyse (n = 2). Auszugsweise Darstellung der Arabinose-, Galactose- und Rhamnosebindungstypen. Für die vollständige Tabelle (inkl. Range/2) wird auf den Anhang verwiesen (Tabelle 30). Die Anteile sind bezogen auf die Gesamtheit aller Bindungstypen (%Ges) sowie auf den Anteil am jeweiligen Monosaccharid (%Ara, %Gal, %Rha) dargestellt. Ara: Arabinose, f: Furanose, Gal: Galactose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, t: terminal

Glykosidische Bindungstypen		pH 2		Autoklav			
		60 min		20 min		60 min	
		%Ges	%Ara	%Ges	%Ara	%Ges	%Ara
Arabinose	t-Araf	30,3	38,8	31,0	36,9	29,2	38,3
	t-Arap	0,5	0,6	0,4	0,5	0,3	0,4
	1,2-Araf	0,9	1,2	0,5	0,6	0,5	0,7
	1,3-Araf	1,7	2,2	1,1	1,3	1,1	1,4
	1,5-Araf	22,6	29,0	24,5	29,2	22,2	29,1
	1,3,5-Araf	16,4	21,0	20,6	24,5	17,6	23,1
	1,2,5-Araf	1,8	2,3	1,7	2,0	1,7	2,2
	1,2,3,5-Araf	3,8	4,9	4,2	5,0	3,6	4,7
		%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal
Galactose	t-Galp	3,4	24,5	2,4	25,0	3,6	27,5
	1,3-Galp	1,5	10,8	1,1	11,5	1,3	9,9
	1,4-Galp	4,1	29,5	2,5	26,0	3,9	29,8
	1,6-Galp	2,4	17,3	1,4	14,6	2,2	16,8
	1,2,4-Galp	0,2	1,4	0,2	2,1	0,1	0,8
	1,3,4-Galp	0,3	2,2	0,3	3,1	0,3	2,3
	1,3,6-Galp	2,0	14,4	1,7	17,7	1,7	13,0
		%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha
Rhamnose	1,2-Rhap	1,9	47,5	1,1	44,0	1,7	47,2
	1,2,4-Rhap	2,1	52,5	1,4	56,0	1,9	52,8

4.2.2.4 PROTEINGEHALT

SBP sind durch im Vergleich zu Apfel- und Citruspektin hohe Proteingehalte gekennzeichnet (Schmidt *et al.* 2015b; Leroux *et al.* 2003). Yapo *et al.* (2007a) konnten für verschiedene säureextrahierte SBP Proteingehalte zwischen 0,9 und 8,6 % feststellen (Yapo *et al.* 2007a). Die in dieser Arbeit extrahierten SBP wiesen Proteingehalte von 1,4 - 8,8 % auf. Die Proteingehalte der durch Autoklavenbehandlung ohne vorherige pH-Wert Einstellung (pH 4,6) extrahierten Pektine waren dabei mit 1,4 - 2,6 % vergleichsweise gering (Tabelle 8). Diese Beobachtung könnte mit den geringen M_w der autoklavenextrahierten Pektine in Verbindung stehen. Auch wenn es nicht zweifelsfrei bewiesen ist, so ist es wahrscheinlich, dass hydroxyprolinreiche Proteine wie AGP kovalente Verbindungspunkte zwischen verschiedenen Pektinstrukturelementen darstellen (Oosterveld *et al.* 2002; Kirby *et al.* 2006; Funami *et al.* 2007; Tan *et al.* 2013; Wang *et al.* 2021).

4 Ergebnisse und Diskussion

Teilweise Spaltungen dieser Verknüpfungen durch die Autoklavenbehandlung könnten daher ein Grund für die geringeren M_w der bei pH 4,6 autoklavenextrahierten SBP sein. Allgemein sind jedoch die bereits diskutierten Spaltungen des Galacturonanrückgrats vermutlich als zugrundeliegender Hauptmechanismus zu nennen.

Tabelle 8: Proteingehalte (% \pm Range/2 bzw. Standardabweichung) von Zuckerrübenpektinen, die durch unterschiedliche Bedingungen extrahiert wurden. Die Proteingehalte wurden nach Kjeldahlaufschluss aus dem Stickstoffgehalt mittels ammoniaksensitiver Elektrode bestimmt (Umrechnungsfaktor 6,25, $n = 2$). Die angegebenen Zeiten und pH-Werte geben die entsprechenden Extraktionsbedingungen an. *: $n = 3$

Säureextraktion	Proteingehalt / %		
	pH 2*	pH 3	
1 h	6,0 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	
2 h	6,6 \pm 0,2	3,5 \pm 0,1	
4 h	6,6 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1	
16 h	6,8 \pm 0,2	4,6 \pm 0,1	
Citronensäureextraktion	pH 2	pH 3	pH 4
16 h	6,7 \pm 0,1	5,0 \pm 0,1	3,7 \pm 0,1
Autoklavenextraktion	pH 2,5	pH 3,5	pH 4,6
20 min	8,8 \pm 0,1	4,1 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1
40 min	-	-	1,4 \pm 0,3
60 min	-	-	2,6 \pm 0,1

Allgemein waren die Proteingehalte der SBP, die bei niedrigeren pH-Werten extrahiert wurden, höher als die der bei höheren pH-Werten extrahierten Pektine. Beispielfhaft kann dies an den für 16 h bei pH 2, 3 und 4 unter Citronensäurezusatz extrahierten SBP und den durch 20-minütige Autoklavenbehandlung bei pH 2,5, 3,5 und 4,6 extrahierten Pektinen (Tabelle 8) gezeigt werden. Aber auch bei Betrachtung der Gesamtheit der extrahierten SBP kann ein Trend hin zu höheren Proteingehalten bei höherer Säurekonzentration während der Extraktion beobachtet werden. Dementsprechend scheint ein Teil der in Zuckerrüben vorliegenden Proteine erst bei harschen Bedingungen aus dem Zellwandkomplex herausgelöst zu werden. Yapo *et al.* (2007a) konnten ebenfalls für SBP eine Abhängigkeit des Proteingehalts vom pH-Wert des Extraktionsmediums beobachten, jedoch im pH-Bereich 1,5 bis 2. Dabei konnten sie bei einem pH-Wert von 1,5 niedrigere Proteingehalte nachweisen als beim höheren pH-Wert (Yapo *et al.* 2007a), was auf eine partielle Hydrolyse durch die stark sauren Bedingungen schließen lässt. In Kombination mit den in dieser Arbeit erarbeiteten Erkenntnissen deutet dies auf eine maximale Proteinextraktion bei einem pH-Wert von 2 hin. Tendenziell konnten auch erhöhte Proteingehalte

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

bei längeren Extraktionszeiten festgestellt werden, wobei die Zeitabhängigkeit schwächer ausgeprägt und nicht eindeutig ist (Tabelle 8). Dementsprechend scheint der pH-Wert des Extraktionsmediums der Parameter zu sein, der den Proteingehalt des Extrakts maßgeblich bestimmt.

4.2.2.5 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER PROTEINFRAKTION

Zur näheren Charakterisierung wurde die Aminosäurezusammensetzung der Proteinfraction ausgewählter Pektine mittels Säurehydrolyse und anschließender AQC-Derivatisierung analysiert. In Abbildung 18 sind stellvertretend die Aminosäureverteilungen von vier säureextrahierten SBP (pH 2; 1 - 16 h), zwei unter Citronensäurezugabe extrahierten Pektinen (pH 3; 4 bzw. 16 h) sowie zwei autoklavenextrahierten SBP (pH 4,6; 20 bzw. 60 min) abgebildet.

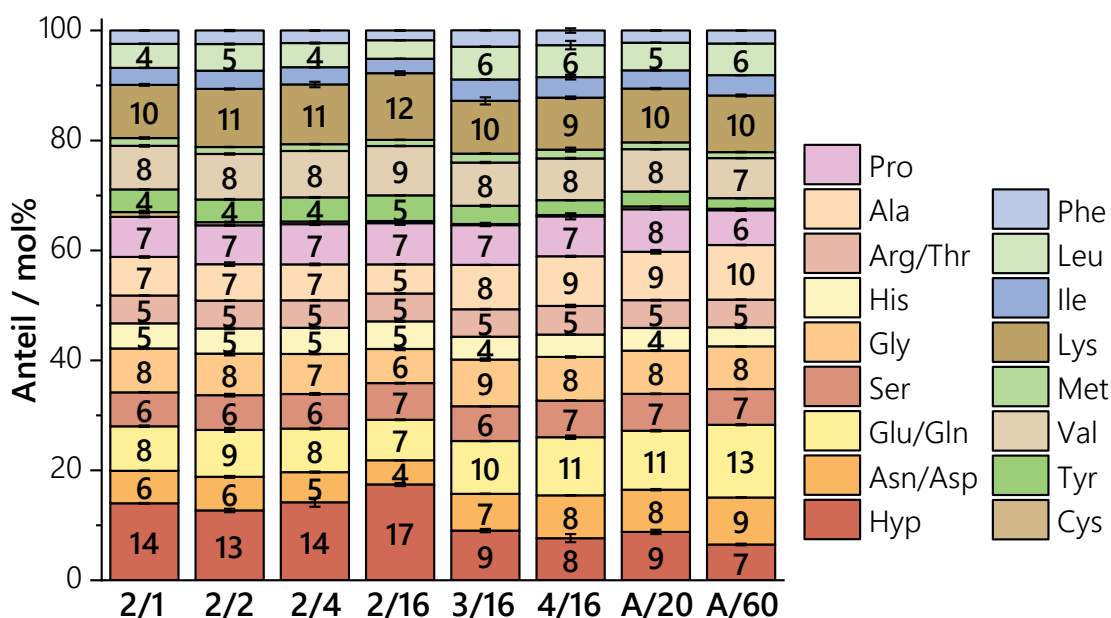


Abbildung 18: Aminosäurezusammensetzungen der Proteinfractionen unterschiedlich extrahierter Zuckerrübenpektine, nach Hydrolyse und 6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamat-(AQC)-Derivatisierung. 2/1, 2/2, 2/4, 2/16: säureextrahierte Pektine (pH 2; 1, 2, 4 bzw. 16 h Extraktionszeit), 3/16: säureextrahierte Pektine (pH 3; 1, 2, 4 bzw. 16 h Extraktionszeit), 4/16: säureextrahiertes Pektin (pH 4; 16 h Extraktionszeit), A/20, A/60: autoklavenextrahiertes Pektin (pH 4,6; 20 bzw. 60 min Extraktionszeit), Ala: Alanin, Arg: Arginin, Asn: Asparagin, Asp: Asparaginsäure, Cys: Cystein, Glu: Glutaminsäure, Gln: Glutamin, Gly: Glycin, His: Histidin, Hyp: Hydroxyprolin, Ile: Isoleucin, Leu: Leucin, Lys: Lysin, Met: Methionin, Phe: Phenylalanin, Pro: Prolin, Ser: Serin, Thr: Threonin, Tyr: Tyrosin, Val: Valin

Die bei höheren pH-Werten (3,0 - 4,6) extrahierten SBP weisen ähnliche, relativ ausgeglichene Verteilungen der 20 untersuchten Aminosäuren auf. Im Vergleich zu den Extraktionen bei erhöhten pH-Werten ist bei den säureextrahierten SBP (pH 2,0) unabhängig von der Extraktionszeit ein merklich höherer Hydroxyprolinanteil feststellbar. Mit zunehmender Extraktionszeit verstärkt sich diese Tendenz weiter. Auffällig ist zudem, dass neben Hydroxyprolin auch der Anteil an Lysin zunimmt. Die Zusammensetzung des durch 16-stündige Säureextraktion (pH 2,0) gewonnenen SBP wird schließlich deutlich von Hydroxyprolin (17 mol%) und Lysin (12 mol%) dominiert. Im Vergleich zu den bei höheren pH-Werten extrahierten Pektinen nehmen

4 Ergebnisse und Diskussion

auch die Anteile an Tyrosin, Valin und Histidin zu. Dementsprechend machen HRGP wie AGP einen großen Teil der Proteinfraction von säureextrahierten (pH 2,0) SBP aus. Zusammen mit den höheren Proteingehalten dieser Pektine kann geschlussfolgert werden, dass ein erheblicher Anteil der HRGP erst bei niedrigen pH-Werten aus dem Zellwandkomplex von Zuckerrüben herausgelöst wird. Siew und Williams (2008) konnten vergleichbare Aminosäurezusammensetzungen für verschiedene kommerzielle SBP beobachten.

4.2.2.6 PHENOLISCHE SÄUREN

Arabinose und Galactose, die Hauptmonomere der neutralen Seitenketten, können in SBP mit phenolischen Säuren substituiert vorliegen (Ralet *et al.* 1994b; Fry 1983). Die quantitativ bedeutendste phenolische Säure ist Ferulasäure, wobei der Anteil des *cis*-Isomers bei Lagerung der extrahierten SBP unter Lichtausschluss vernachlässigbar gering ist (Junker *et al.* 2021). Die in dieser Arbeit untersuchten SBP wiesen üblicherweise *trans*-Ferulasäuregehalte von etwa 500 - 800 mg/100 g auf (Tabelle 9). Vergleichbare Werte wurden unter anderem von Yapo *et al.* (2007a) (300 - 800 mg/100 g) und Siew und Williams (2008) (800 - 1100 mg/100 g) berichtet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Monosaccharidanalyse und der Bestimmung des M_w konnten für stark saure Extraktionsbedingungen (pH 2) tendenziell höhere *trans*-Ferulasäuregehalte bei kürzeren Extraktionszeiten festgestellt werden (Tabelle 9). Die Abnahme des *trans*-Ferulasäuregehalts bei härteren Bedingungen kann auf die einhergehende Verringerung des Neutralzuckeranteils zurückgeführt werden. Bei höheren pH-Werten konnten hingegen bei verlängerten Extraktionszeiten trotz abnehmender Neutralzuckeranteile ansteigende *trans*-Ferulasäuregehalte festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte damit zusammenhängen, dass bei diesen Extraktionen die Ausbeute bei kurzen Zeiten sehr gering ist und mit zunehmender Extraktionszeit stark zunimmt. Die bereits diskutierte einhergehende Zunahme des M_w deutet zusammen mit den höheren *trans*-Ferulasäuregehalten darauf hin, dass die erst bei härteren Bedingungen extrahierten und damit stärker in den Zellwandkomplex eingebundenen Pektine eine komplexere, stärker vernetzte Struktur als leichter extrahierbare Pektinmotive aufweisen. Die Gehalte oligomerer Ferulasäuren wurden in dieser Arbeit nicht nähergehend analysiert, da bei unter ähnlichen Bedingungen extrahierten SBP nur geringfügige Unterschiede ersichtlich waren (Junker *et al.* 2021) und daher von einem untergeordneten Einfluss auf die Emulgierereigenschaften ausgegangen werden kann.

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

Tabelle 9: *trans*-Ferulasäuregehalte (mg/100 g ± Range/2 bzw. Standardabweichung) von Zuckerrübenpektinen, die durch unterschiedliche Bedingungen extrahiert wurden. Der *trans*-Ferulasäuregehalt wurde nach Verseifung (2 M Natronlauge; 18 h) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarraydetektion (HPLC-DAD) ermittelt ($\lambda = 323$ nm, $n = 2$). Die angegebenen Zeiten und pH-Werte geben die entsprechenden Extraktionsbedingungen an. *: $n = 3$

Säureextraktion	<i>trans</i> -Ferulasäuregehalt / mg/100g		
	pH 2*	pH 3	
1 h	676 ± 10	523 ± 4	
2 h	682 ± 16	509 ± 7	
4 h	668 ± 47	679 ± 17	
16 h	567 ± 7	750 ± 15	
Citronensäureextraktion	pH 2	pH 3	pH 4
16 h	635 ± 1	661 ± 5	691 ± 5
Autoklavenextraktion	pH 2,5	pH 3,5	pH 4,6
20 min	659 ± 33	721 ± 18	653 ± 29
40 min	-	-	663 ± 5
60 min	-	-	808 ± 21

Neben dem *trans*-Ferulasäuregehalt könnte auch dessen Verteilung innerhalb der verschiedenen Pektinfraktionen Einfluss auf die Emulgiereigenschaften haben. Daher wurde die Verteilung der Ferulasäuresubstituenten mittels SEC-RI/UV untersucht. In Abbildung 19 sind beispielhaft die entsprechenden Chromatogramme der durch 20-minütige (links) bzw. 60-minütige (rechts) Autoklavenbehandlung extrahierten SBP dargestellt. Bei beiden Proben ist beim Vergleich mit dem RI-Signal deutlich zu erkennen, dass die UV-Absorption (323 nm) im vorderen Elutionsbereich intensiver ist als im hinteren Elutionsbereich. Dementsprechend kann geschlossen werden, dass die Substitution mit Ferulasäure nicht gleichmäßig über alle Größenfraktionen verteilt ist, sondern ein Großteil der Ferulasäure in den höhermolekularen Fraktionen zu verorten ist. Ein vergleichbares Bild ergab sich, unabhängig von den Extraktionsbedingungen, auch bei allen anderen untersuchten SBP. Diese Beobachtung könnte damit zusammenhängen, dass bei einer Detektionswellenlänge von 323 nm neben monomerer Ferulasäure unter anderem auch verschiedene oligomere Ferulasäuren erfasst werden (Dobberstein und Bunzel 2010). Ein erhöhter Anteil oligomerer Ferulasäuren in den höhermolekularen Fraktionen ist wahrscheinlich, da diese kovalente Verknüpfungspunkte zwischen einzelnen Pektinmolekülen darstellen können und dementsprechend tendenziell zu einer Erhöhung der mittleren Molekülgröße bzw. des M_w führen. Da im Gegensatz zum Gehalt an monomerer *trans*-Ferulasäure kein direkter Zusammenhang zwischen den Extraktionsbedingungen und der Verteilung der Substitution mit Ferulasäure innerhalb der

4 Ergebnisse und Diskussion

unterschiedlichen Größenfraktionen beobachtet werden konnte, spielt die Verteilung der Substituenten vermutlich eine untergeordnete Rolle für die Emulgierereigenschaften von SBP.

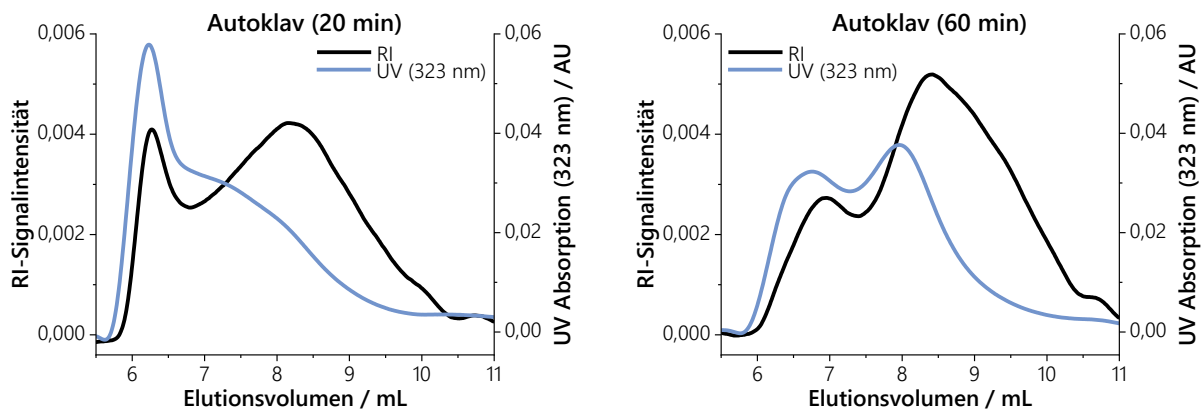


Abbildung 19: Elutionsprofile autoklavenextrahierter Zuckerrübenpektine (pH 4,6; 121 °C; 20 min (links) bzw. 60 min (RI, rechts)), bestimmt mittels SEC (Größenausschlusschromatographie) und Brechungsindexdetektion (schwarz) bzw. UV-Detektion bei 323 nm (blau)

4.2.2.7 METHYLIERUNGSGRAD

Der Methylierungsgrad der Galacturonsäuremonomere der extrahierten SBP variierte zwischen 46 und 76 % und war damit in einem vergleichbar hohen Bereich zu Literaturdaten (Sun und Hughes 1998; Levigne *et al.* 2002a; Leroux *et al.* 2003; Schmidt *et al.* 2015b; Chen *et al.* 2016a). Andere Forschungsgruppen beschrieben teilweise aber auch deutlich niedrigere Methylierungsgrade (14 - 66 %) für unterschiedlich harsch extrahierte SBP (Yapo *et al.* 2007a) oder sukzessiv säureextrahierte SBP-Fractionen (22 - 32 %) (Liu *et al.* 2019).

Bei den bei pH 2 und pH 3 säureextrahierten SBP gingen prolongierte Extraktionszeiten mit sukzessive niedrigeren Methylierungsgraden einher, wobei die Abnahme des Methylierungsgrads auch unter harschen Extraktionsbedingungen nur mäßig war (Tabelle 10). Ein ähnlicher Trend konnte auch von Yapo *et al.* (2007a) für SBP gezeigt werden, die bei pH 1,5 und pH 2 extrahiert wurden. Sun und Hughes (1998) konnten hingegen bei verlängerten Extraktionszeiten bei pH 1,5 höhere Methylierungsgrade feststellen (1 h: 67 %, 4 h: 78 %). Bei den in dieser Arbeit bei pH 2 und pH 3 extrahierten Pektinen ist auffällig, dass die Pektine, die für die gleiche Zeitspanne bei unterschiedlichen pH-Werten extrahiert wurden, vergleichbare Methylierungsgrade ermittelt werden konnten (Tabelle 10). Demnach scheint die thermische Beanspruchung ausschlaggebend für die partielle Demethylierung zu sein. Yapo *et al.* (2007a) schlussfolgerten hingegen, dass der pH-Wert einen stärkeren Einfluss auf den Methylierungsgrad hat als die Extraktionszeit. Diese gegensätzlichen Beobachtungen können jedoch dadurch erklärt werden, dass in der genannten Studie lediglich Extraktionszeiten von 1 bzw. 4 h bei pH 1,5 bzw. 2 untersucht wurden. Dementsprechend scheint der pH-Wert bei Werten < 2 einen entscheidenden Einfluss auf den Methylierungsgrad zu haben, während die Extraktionstemperatur bei pH-Werten > 2 einen stärkeren Effekt hat. Dafür würden auch die bereits genannten niedrigen Methylierungsgrade

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

verschiedener SBP-Fractionen sprechen, die von (Liu *et al.* 2019) ebenfalls bei pH 1,5 gewonnen wurden.

Tabelle 10: Methylierungsgrade (% ± Range/2 bzw. Standardabweichung) von Zuckerrübenpektinen, die durch unterschiedliche Bedingungen extrahiert wurden. Der Methylierungsgrad wurde aus dem nach Verseifung mittels ¹H-Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) bestimmten Methanolgehalt und dem photometrisch bestimmten Uronsäuregehalt berechnet (n = 2). Die angegebenen Zeiten und pH-Werte geben die entsprechenden Extraktionsbedingungen an. *: n = 3

Säureextraktion	Methylierungsgrad / %		
	pH 2*	pH 3	
1 h	70,6 ± 2,6	73,7 ± 0,2	
2 h	62,1 ± 0,6	62,7 ± 2,5	
4 h	59,8 ± 2,3	61,6 ± 0,5	
16 h	56,4 ± 2,5	58,5 ± 2,4	
Citronensäureextraktion	pH 2	pH 3	pH 4
16 h	54,8 ± 0,2	65,0 ± 2,7	59,6 ± 2,1
Autoklavenextraktion	pH 2,5	pH 3,5	pH 4,6
20 min	60,1 ± 0,4	66,3 ± 0,5	67,9 ± 2,2
40 min	-	-	74,2 ± 3,4
60 min	-	-	77,0 ± 1,9

Die vergleichsweise hohe Stabilität und damit der untergeordnete Einfluss des pH-Werts im Bereich 2 - 4 auf die Methylester kann darauf zurückgeführt werden, dass die untersuchten Pektine in einem, im Vergleich zu herkömmlichen Säureextraktionen, milden pH-Bereich extrahiert wurden und daher keine verstärkte säurekatalysierte Esterhydrolyse stattfindet. Dementsprechend weisen auch die unter Citronensäurezusatz gewonnenen SBP nach 16 h Extraktionszeit bei pH 2, 3 und 4 noch hohe Methylierungsgrade auf (Tabelle 10). Allerdings konnten bei den durch unterschiedlich lange Autoklavenbehandlung bei pH 4,6 extrahierten Pektine leicht erhöhte Methylierungsgrade für die SBP ermittelt werden, die länger extrahiert wurden (Tabelle 10). Vermutlich ist dieser gegenteilige Effekt darauf zurückzuführen, dass mit zunehmender Extraktionszeit weitere, tiefer in den Zellwandkomplex eingebundene SBP mit höheren Methylierungsgraden extrahiert werden. Im Gegensatz zum Säureextraktionsverfahren scheinen Demethylierungsreaktionen unter diesen Bedingungen noch nicht verstärkt abzulaufen.

4.2.2.8 ACETYLIERUNGSGRAD

Neben der Methylierung der Säuregruppe können die Galacturonsäureeinheiten auch an O2 und/oder O3 einfach oder zweifach acetyliert vorliegen. Für die in dieser Arbeit untersuchten SBP wurden Acetylierungsgrade von etwa 16 - 56 % ermittelt (Tabelle 11). In der Literatur werden für SBP Acetylierungsgrade von 10 - 43 % (Levigne *et al.* 2002a), 16 - 32 % (Liu *et al.* 2019) oder 3 - 29 % (Yapo *et al.* 2007a) und damit tendenziell niedrigere Werte beschrieben. Im Vergleich zum Methylierungsgrad sind die Unterschiede beim Acetylierungsgrad stärker ausgeprägt. Analog zum Methylierungsgrad ist auch für den Acetylierungsgrad eine Abhängigkeit von den gewählten Prozessparametern zu beobachten, wobei die Zusammenhänge weniger eindeutig sind.

Tabelle 11: Acetylierungsgrade (% \pm Range/2 bzw. Standardabweichung) von Zuckerrübenpektinen, die durch unterschiedliche Bedingungen extrahiert wurden. Der Acetylierungsgrad wurde aus dem nach Verseifung mittels ^1H -Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) bestimmten Essigsäuregehalt und dem photometrisch bestimmten Uronsäuregehalt berechnet ($n = 2$). Die angegebenen Zeiten und pH-Werte geben die entsprechenden Extraktionsbedingungen an. *: $n = 3$

Säureextraktion	Acetylierungsgrad / %		
	pH 2*	pH 3	
1 h	46,2 \pm 1,7	45,3 \pm 0,1	
2 h	38,4 \pm 0,2	38,1 \pm 0,9	
4 h	33,5 \pm 1,7	42,1 \pm 1,1	
16 h	16,0 \pm 0,8	38,0 \pm 1,9	
Citronensäureextraktion	pH 2	pH 3	pH 4
16 h	20,7 \pm 0,1	40,5 \pm 1,9	38,8 \pm 1,5
Autoklavenextraktion	pH 2,5	pH 3,5	pH 4,6
20 min	40,5 \pm 0,2	46,5 \pm 0,2	43,4 \pm 0,5
40 min	-	-	50,7 \pm 1,8
60 min	-	-	56,4 \pm 1,0

Bei den bei pH 2 extrahierten Pektinen ist mit zunehmender Extraktionszeit eine sukzessive Verringerung des Acetylierungsgrads zu beobachten (Tabelle 11). Bei den entsprechenden bei pH 3 extrahierten Pektinen ist jedoch kein Trend hin zu geringeren Werten bei längeren Extraktionszeiten erkennbar. Auch nach 16 h beträgt der ermittelte Acetylierungsgrad noch etwa 38 %, während bei dem für 16 h bei pH 2 extrahierten Pektin nur noch ein Acetylierungsgrad von 16 % bestimmt werden konnte. Demzufolge scheint die Temperatureinwirkung bei milden pH-Werten nur in einer geringfügigen Deacetylierung des Galacturonanrückgrats zu resultieren. Bei

4.2 Abhängigkeit verschiedener Parameter von den Extraktionsbedingungen

zusätzlicher Säureeinwirkung (pH 2) kommt es hingegen zu einer verstärkten Freisetzung von Essigsäure. Levigne *et al.* (2002a) sowie Yapo *et al.* (2007a) konnten ebenfalls zeigen, dass der Acetylierungsgrad insbesondere durch den pH-Wert beeinflusst wird. Dementsprechend wurden auch bei den unter Säureeinwirkung autoklavenextrahierten Pektinen niedrigere Acetylierungsgrade bei zunehmender Säurekonzentration festgestellt (Tabelle 11). Die bei pH 4,6 extrahierten Autoklavenpektine wiesen jedoch, analog zu den höheren Methylierungsgraden, bei längeren Extraktionszeiten höhere Acetylierungsgrade auf. Trotz intensiver Hitzebehandlung kommt es demnach nicht zu Deacetylierungsreaktionen, was den entscheidenden Einfluss des pH-Werts hervorhebt. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die erst später freigesetzten Pektinfraktionen neben einem höheren Methylierungsgrad auch einen höheren Acetylierungsgrad aufweisen.

4.2.3 ABHÄNGIGKEIT DER EMULGIEREIGENSCHAFTEN VON DEN EXTRAKTIONS-BEDINGUNGEN

Die hohe strukturelle Vielfalt der diskutierten SBP lässt vermuten, dass auch deren Fähigkeit, Öltröpfchen in wässriger Umgebung zu stabilisieren, variiert. Im Folgenden werden die Zusammenhänge zwischen den Extraktionsbedingungen, unter denen die jeweiligen Pektine extrahiert wurden, und deren Emulgiereigenschaften diskutiert.

SÄUREEXTRAKTION. Bei einem pH-Wert von 2 ist eine stetige Verschlechterung der Emulgiereigenschaften mit zunehmender Extraktionszeit zu beobachten. Die $x_{90,3}$ -Werte, und damit die mittlere Tropfengröße, nehmen sukzessive von 0,81 μm (1 h) auf 1,09 μm (16 h) zu (Tabelle 12). In abgeschwächter Form ist dieser Trend auch bei geringerer Säurekonzentration (pH 3) erkennbar. Von 2 h Extraktionszeit ($x_{90,3}$: 0,70 μm) auf 16 h Extraktionszeit ($x_{90,3}$: 0,86 μm) nehmen die mittleren Tropfengrößen zu, sind aber auch nach 16 h noch deutlich unter 1 μm und damit in einem sehr guten Bereich. Lediglich das Pektin, das durch einstündige Extraktion bei pH 3 gewonnen wurde, weist mit einem $x_{90,3}$ von 1,23 μm deutlich schlechtere Emulgiereigenschaften auf. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich dieses Pektin auch strukturell deutlich von den weiteren bei pH 3 extrahierten Pektinen unterscheidet (siehe Abschnitt 4.2.2). Da bei diesen Extraktionsbedingungen auch eine äußerst geringe Pektinausbeute erzielt wurde, kann vermutet werden, dass es sich bei den extrahierten Strukturen größtenteils um leicht lösliche bzw. nicht stark in den Zellwandkomplex integrierte Pektinstrukturen handelt. Bei pH 4 ist auch nach 16 h Extraktionszeit keine deutliche Abnahme der stabilisierten Tropfengröße erkennbar. Mit einem $x_{90,3}$ von 0,76 μm konnten auch nach 16 h Extraktionszeit noch hervorragende Emulgiereigenschaften festgestellt werden (Tabelle 12). Demnach werden die Emulgiereigenschaften von SBP maßgeblich durch die Extraktionszeit und den pH-Wert des Extraktionsmilieus bestimmt, was aufgrund der im vorherigen Abschnitt beschriebenen strukturellen Unterschiede zwischen den jeweiligen Pektinen zu erwarten war. Eine deutliche, negative Beeinflussung der Eigenschaften durch verlängerte Extraktionszeiten konnte nur bei hoher Säurekonzentration festgestellt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12: $x_{90,3}$ -Werte ($n = 3 \pm$ Standardabweichung) der (o/w)-Modellemulsionen von Zuckerrübenpektinen, die durch unterschiedliche Bedingungen extrahiert wurden. Die Emulsionen wurden mit 10% Dispersphasenanteil und 0,5 %iger Pektinlösung (pH 5) als kontinuierliche Phase hergestellt (siehe Abschnitt 3.4). Die angegebenen Zeiten und pH-Werte geben die entsprechenden Extraktionsbedingungen an

Säureextraktion	$x_{90,3} / \mu\text{m}$		
	pH 2	pH 3	
1 h	0,81 \pm 0,01	1,23 \pm 0,06	
2 h	0,97 \pm 0,01	0,70 \pm 0,01	
4 h	1,03 \pm 0,02	0,84 \pm 0,01	
16 h	1,09 \pm 0,01	0,86 \pm 0,01	
Citronensäureextraktion	pH 2	pH 3	pH 4
16 h	1,16 \pm 0,03	0,89 \pm 0,02	0,76 \pm 0,01
Autoklavenextraktion	pH 2,5	pH 3,5	pH 4,6
20 min	1,04 \pm 0,02	0,76 \pm 0,01	0,79 \pm 0,01
40 min	-	-	0,96 \pm 0,03
60 min	-	-	13,6 \pm 2,2

AUTOKLAVENEXTRAKTION. Die Emulgiereigenschaften von autoklavenextrahierten Pektinen, die ohne Säurezugabe (pH \sim 4,6) gewonnen wurden, weisen eine starke Abhängigkeit von der Dauer der Autoklavenbehandlung auf. Mit zunehmender Extraktionszeit geht eine gravierende Zunahme der stabilisierten Tropfengrößen einher (Tabelle 12). Während die Zunahme des $x_{90,3}$ -Werts bei einer Erhöhung der Behandlungsdauer von 20 min ($x_{90,3}$: 0,79 μm) auf 40 min ($x_{90,3}$: 0,96 μm) noch moderat ist, ist ein sprunghafter Anstieg der Tropfengröße bei einer Extraktionszeit von 60 min ($x_{90,3}$: 13,6 μm) zu beobachten. Bei den Pektinen, die durch 20-minütige Autoklavenbehandlung bei niedrigeren pH-Werten extrahiert wurden, konnte eine unterschiedliche Beeinflussung der Emulgiereigenschaften beobachtet werden (Tabelle 12). Im Vergleich zu dem ohne Säurezugabe extrahierten Pektin ist bei dem bei pH 3,5 gewonnenen Extrakt keine Erhöhung der mittleren Tropfengröße zu sehen ($x_{90,3}$: 0,76 μm). Eine weitere pH-Absenkung auf 2,5 resultiert hingegen in einem Pektin mit schlechteren Emulgiereigenschaften ($x_{90,3}$: 1,04 μm). Demnach führen bereits kurze Autoklavenbehandlungen bei pH 2,5 ebenso wie anhaltende thermische Behandlungen bei pH 4,6 zu einer Verschlechterung der Emulgiereigenschaften des extrahierten Pektins.

Unabhängig von der angewandten Extraktionsmethode hatten die Pektine die besten Emulgiereigenschaften, die unter milden Bedingungen extrahiert wurden. Neben kurzen Extraktionszeiten bei pH 2 fallen hierunter insbesondere SBP, die bei pH-Werten von 3 - 4

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

extrahiert wurden. Auch deutlich verlängerte Extraktionszeiten bewirkten in diesem pH-Bereich höchstens moderate Verschlechterungen der Eigenschaften. Wie in Abschnitt 4.2.2 dargelegt, sind diese Pektine vergleichsweise gering durch den Extraktionsprozess modifiziert worden. In diesem pH-Bereich säureextrahierte SBP sind durch hohe M_w und *trans*-Ferulasäuregehalte, arabinosedominierte Monosaccharidzusammensetzungen sowie hohe Acetylierungs- und Methylierungsgrade gekennzeichnet. Dementsprechend kann festgehalten werden, dass ein weitestgehender Erhalt der nativen Pektinstruktur im Zuge der Extraktion Voraussetzung für gute Emulgiereigenschaften von SBP zu sein scheint.

Aufgrund der vielen parallel ablaufenden Abbaureaktionen während des Extraktionsprozesses sind bei der isolierten Betrachtung einzelner SBP jedoch zunächst keine direkten Rückschlüsse auf den Einfluss bestimmter Strukturcharakteristika auf die Emulgiereigenschaften möglich. Daher werden im folgenden Abschnitt unterschiedliche methodische Ansätze diskutiert, die die funktionellen Zusammenhänge zwischen bestimmten Strukturmotiven und den Eigenschaften nähergehend analysieren.

4.3 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN MOLEKÜLSTRUKTUR UND EMULGIEREIGENSCHAFTEN

Die Ergründung kausaler Struktur-Eigenschaftszusammenhänge wird bei SBP durch den komplexen strukturellen Aufbau erschwert. Neben der Vielzahl an unterschiedlichen Strukturmotiven stehen insbesondere deren verschiedenartig wechselnde Anteile einer zweifelsfreien Bestimmung der Zusammenhänge entgegen.

4.3.1 STRUKTUR-EIGENSCHAFTSKORRELATIONEN SÄUREEXTRAHIERTER PEKTINE

Zunächst erfolgte die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen bestimmten Strukturmerkmalen und den Emulgiereigenschaften anhand von insgesamt 43 SBP. Diese wurden durch die im Zuge der Methodenentwicklung (Abschnitt 4.1) und der Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Extraktionsbedingungen und den strukturellen Eigenschaften (Abschnitt 4.2.2) diskutierten Methoden gewonnen. Die Emulgiereigenschaften dieser strukturell umfassend charakterisierten Pektine wurden durch die Herstellung von Modellemulsionen analysiert. Anhand der Auftragung der Strukturparameter gegen den entsprechenden $x_{90,3}$ -Wert aus der Tropfengrößenverteilung können so Rückschlüsse über mögliche Korrelationen zwischen einzelnen Struktureinheiten und den Emulgiereigenschaften gezogen werden.

Um aus diesen Auftragungen substanzielle Rückschlüsse ziehen zu können, ist es jedoch, aufgrund der hohen strukturellen Komplexität von SBP sowie den bereits diskutierten vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten im Zuge der Extraktion, unabdingbar, dass eine hohe Probenzahl sowie eine große Bandbreite an unterschiedlichen Strukturen analysiert wird. Diese

4 Ergebnisse und Diskussion

Voraussetzungen werden erfüllt, da bereits die in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen SBP den Bereich von nur marginal bis hin zu stark modifizierten Pektinstrukturen abdecken. Zur Erhöhung der Probenzahl und der strukturellen Diversität wurden zusätzlich auch Pektine für die Aufstellung der Struktur-Eigenschaftskorrelationen herangezogen, die sich nicht nur durch die Extraktionsdauer oder den pH-Wert unterschieden. So wurden unter anderem der Mahlgrad des Ausgangsmaterials, das S/L oder das IPA-zu-Extrakt-Verhältnis während der Fällung variiert. Neben den klassisch säureextrahierten SBP wurden auch Pektine miteinbezogen, bei denen zur Ausbeutesteigerung Inkubationen mit verschiedenen (hemi-) cellulolytischen Enzymen durchgeführt wurden.

Autoklavenextrahierte Pektine wurden nicht für die Struktur-Eigenschaftskorrelationen herangezogen, da sie sich methodisch bedingt strukturell und daher bezüglich ihrer Emulgierereigenschaften teilweise grundlegend von säureextrahierten Pektinen unterscheiden. Die Struktur-Eigenschaftsbeziehungen von autoklavenextrahierten SBP werden daher in Abschnitt 4.3.2 diskutiert. SBP, die durch sehr geringe Ausbeuten gekennzeichnet sind (< 5 %), wurden ebenfalls nicht in die Korrelationen miteinbezogen. Wie bereits beim durch einstündige Extraktion bei pH 3 gewonnenen Pektin diskutiert (Abschnitt 4.2.2), sind diese Pektine unter anderem durch niedrige M_w gekennzeichnet, die zusammen mit den geringen Ausbeuten darauf schließen lassen, dass keine intakten Moleküle extrahiert wurden und dementsprechend die Pektinstruktur von SBP nicht repräsentativ abgebildet wird. Die Extraktionsbedingungen sowie die Ausbeute-, Struktur- und Emulgierereigenschaftsparameter aller für die Korrelationen eingesetzten SBP sind in Tabelle 31 und Tabelle 32 zusammengefasst dargestellt.

4.3.1.1 PROTEINGEHALT VS. $x_{90,3}$

Wie in Abschnitt 1.5.2 dargestellt, wird der im Vergleich zu anderen Pektinen hohe Proteingehalt von SBP häufig als einer der Parameter genannt, der den guten Emulgierereigenschaften von SBP zugrunde liegt.

In Abbildung 20 ist der Proteingehalt der in dieser Arbeit extrahierten Pektine gegen den entsprechenden $x_{90,3}$ -Wert aufgetragen. Im untersuchten Wertebereich kann kein Trend ausgemacht werden, der auf eine Korrelation zwischen höherem Proteingehalt und besseren Emulgierereigenschaften hinweist. Im Gegenteil lassen die Daten, zumindest im Bereich von 5 - 8 % Protein, auf höhere $x_{90,3}$ -Werte bei höheren Proteingehalten schließen. Im Bereich von 2 - 5 % sind die durchschnittlichen Tropfengrößen hingegen durchweg niedrig und es ist kein Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt und den Emulgierereigenschaften erkennbar. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass alle untersuchten Pektine ein erforderliches Mindestmaß an assoziiertem Protein aufweisen, das für gute Emulgierereigenschaften notwendig ist. Bei Überschreitung dieses Schwellenwerts bzw. -bereichs kommt es zu keiner weiteren Verbesserung der Eigenschaften. Eine weitere Steigerung des Proteingehalts führt dahingegen zu einer negativen Beeinflussung der Emulgierereigenschaften, vermutlich durch die damit einhergehenden geringeren Anteile an Nicht-Proteinbestandteilen der Pektine. Chen *et al.* (2016b) postulierten

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgierereigenschaften

eine ähnliche Hypothese, wonach der Proteingehalt zwischen 0,5 und 3 % einen starken Einfluss auf die Tropfengröße der Emulsionen hat. Bei Gehalten zwischen 3 und 6 % konnte hingegen keine weitere Verbesserung der Emulgierereigenschaften beobachtet werden (Chen *et al.* 2016b). Funami *et al.* (2007) konnten ebenfalls im Bereich < 1,5 % einen deutlichen Einfluss des Proteingehalts auf die Emulgierereigenschaften ausmachen.

Bei den in dieser Arbeit unter unterschiedlichsten Extraktionsbedingungen säureextrahierten SBP wurden durchweg hinreichend hohe Proteingehalte > 2 % festgestellt. Dementsprechend kann geschlussfolgert werden, dass bei säureextrahierten SBP generell kein positiver Zusammenhang zwischen erhöhten Proteingehalten und den Emulgierereigenschaften besteht.

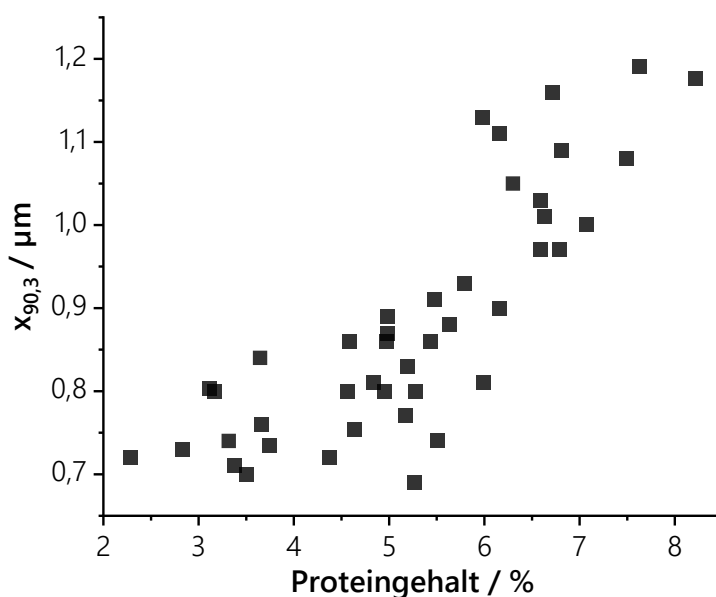


Abbildung 20: Auftragung der Proteingehalte der 43 unterschiedlich extrahierten Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

4.3.1.2 METHYLIERUNGSGRAD VS. $x_{90,3}$

Für den Methylierungsgrad wird, wie in Abschnitt 1.5.2 diskutiert, insbesondere von einem Einfluss auf die Langzeitstabilität von Emulsionen ausgegangen.

Die Methylierungsgrade der in dieser Arbeit untersuchten Pektine variierten im Bereich von etwa 45 bis 75 %. Bei der Auftragung der Methylierungsgrade gegen den entsprechenden $x_{90,3}$ -Wert ergibt sich eine Tendenz hin zu niedrigeren $x_{90,3}$ -Werten bei höheren Methylierungsgraden (Abbildung 21). Allerdings sind die Datenpunkte relativ breit verteilt (z.B. bei 61 % Methylierungsgrad: $x_{90,3}$ von 0,7 - 1,2), was auf keinen direkten Zusammenhang mit den Emulgierereigenschaften schließen lässt. Demzufolge scheint die Beeinflussung des hydrophoben Charakters sowie generell der Moleküleigenschaften und -wechselwirkungen durch den Methylierungsgrad zumindest im Bereich von etwa 50 - 75 % nur gering auszufallen. Vermutlich ist diese Beobachtung auf den dominanteren Einfluss anderer Strukturelemente auf die Emulgierereigenschaften zurückzuführen.

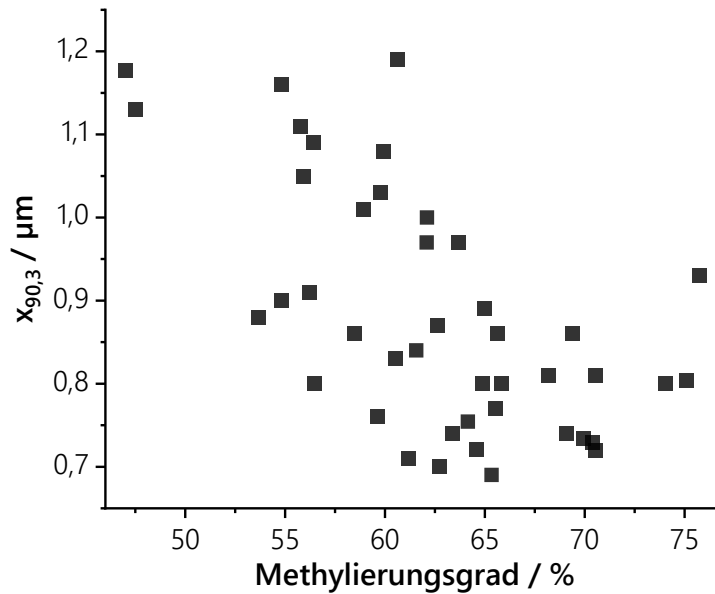


Abbildung 21: Auftragung der Methylierungsgrade der 43 unterschiedlich extrahierten Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

4.3.1.3 ACETYLIERUNGSGRAD VS. $x_{90,3}$

Der hohe Acetylierungsgrad stellt eine Besonderheit von SBP dar und wird, wie in Abschnitt 1.5.2 beschrieben, häufig mit den guten Emulgierereigenschaften in Verbindung gebracht.

Die ermittelten Acetylierungsgrade der 43 extrahierten SBP variierten im Bereich von 15 % bis 52 % und sind in Abbildung 22 gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte aufgetragen. Für Acetylierungsgrade von etwa 15 % bis 35 % ist ein leichter Trend hin zu besseren Emulgierereigenschaften bei höheren Acetylierungsgraden zu erkennen. Für Acetylierungsgrade über 35 % ist jedoch kein Zusammenhang erkennbar, da die $x_{90,3}$ -Werte über den gesamten Bereich zwischen 0,7 und 1,0 μm variierten. Diese Beobachtung kann so interpretiert werden, dass beim Acetylierungsgrad, analog zum Proteingehalt, ein gewisses Mindestmaß erforderlich ist, damit das SBP mit der Ölphase interagieren kann. Bei niedrigeren Acetylierungsgraden wirken sich zusätzliche Acetylgruppen im (Rhamno-) Galacturonanrückgrat somit deutlich auf die Hydrophobizität und damit auch auf die Grenzflächenaktivität des Pektins aus. Bei bereits hohen Acetylierungsgraden sind die Auswirkungen weiterer Acetylsubstitutionen auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Moleküls hingegen schwächer ausgeprägt, sodass auch die Emulgierereigenschaften in geringerem Maße beeinflusst werden. Dementsprechend scheinen bei SBP mit Acetylierungsgraden von etwa 35 - 52 % die Anteile anderer Strukturelemente einen größeren Einfluss auf die Emulgierereigenschaften zu haben.

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgierereigenschaften

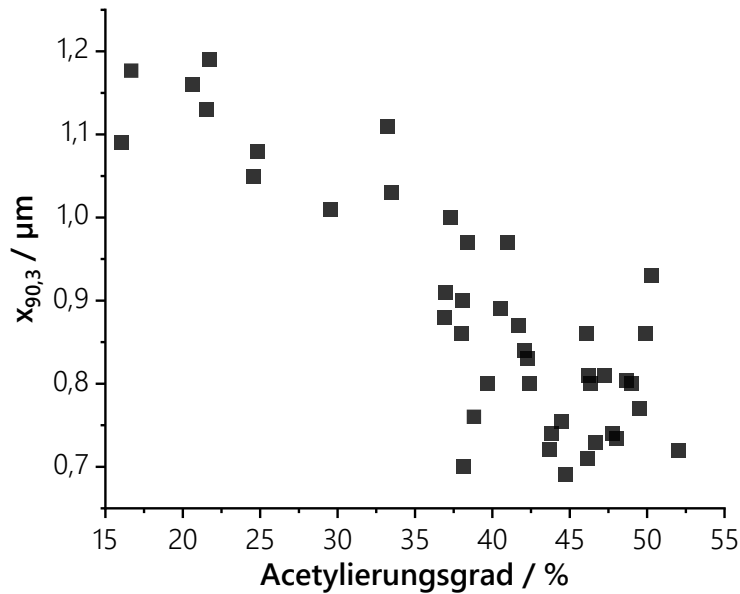


Abbildung 22: Auftragung der Acetylierungsgrade der 43 unterschiedlich extrahierten Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

4.3.1.4 GALACTURONSÄUREANTEIL VS. $x_{90,3}$

Neben dem Methylierungs- und Acetylierungsgrad könnte auch der Gesamtanteil an Galacturonsäure Auswirkungen auf die Emulgierereigenschaften von SBP haben. In Abbildung 23 sind die molaren Galacturonsäureanteile der analysierten SBP gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte aufgetragen.

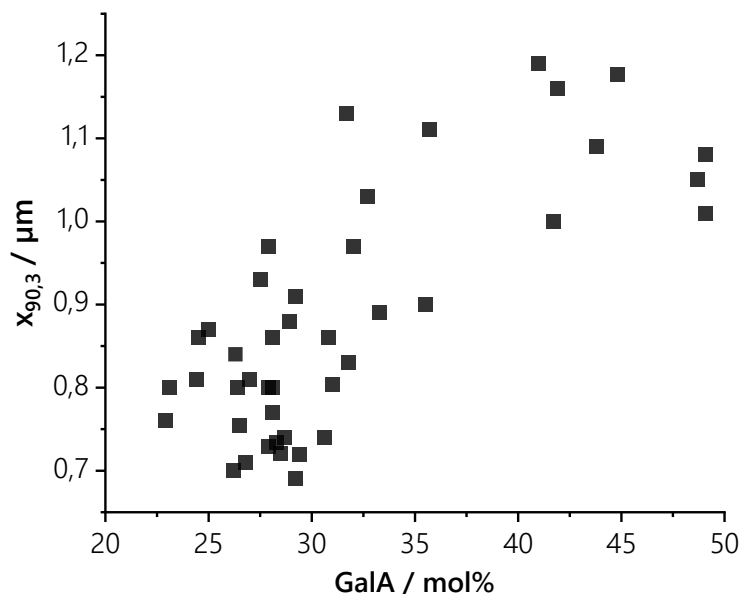


Abbildung 23: Auftragung der Galacturonsäureanteile (Gala, mol%) der 43 unterschiedlich extrahierten Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

Für den untersuchten Bereich von etwa 22 - 50 mol% ist eine Tendenz hin zu kleineren $x_{90,3}$ -Werten bei niedrigeren Galacturonsäureanteilen erkennbar. Im Bereich von < 35 mol% deuten

4 Ergebnisse und Diskussion

die Ergebnisse auf einen linearen Zusammenhang hin. Im Bereich oberhalb von 35 mol% ist aufgrund der starken Streuung kein eindeutiger Trend auszumachen, die Pektine weisen jedoch vergleichsweise schlechte Emulgierereigenschaften auf. Dementsprechend können die Emulgierereigenschaften von SBP nicht vollständig über den Galacturonsäureanteil erklärt werden. Tendenziell korrelieren jedoch niedrigere Galacturonanteile mit besseren Eigenschaften, weshalb es wahrscheinlich ist, dass sich erhöhte Anteile anderer Polysaccharidstrukturen positiv auf die Emulgierereigenschaften von SBP auswirken.

4.3.1.5 ANTEIL NEUTRALER SEITENKETTEN VS. $X_{90,3}$

Wie in Abschnitt 1.5.2 beschrieben, ist der positive Einfluss erhöhter Anteile an neutralen Seitenketten auf die Langzeitstabilität von Emulsionen gut belegt, während in verschiedenen Studien ein mäßig ausgeprägter und nicht durchweg positiver Einfluss auf die initiale Tropfengröße beschrieben wurde.

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der neutralen Seitenketten der Quotient aus der Summe von Arabinose und Galactose (mol%) und der Summe von Rhamnose und Galacturonsäure (mol%) gebildet. Unter der vereinfachenden Annahme, dass die neutralen Pektinseitenketten lediglich aus Arabinose- und Galactosemonomeren aufgebaut sind, stellt dieser Quotient das Verhältnis von neutralen Seitenketten zum HG-/RG-Rückgrat dar. Für die untersuchten SBP wurden Seitenketten-zu-Rückgrat Verhältnisse von etwa 0,5 - 2,2 ermittelt. Demnach umfassen die Untersuchungen, wie bereits diskutiert, sowohl seitenkettenarme Pektine als auch Pektine, die durch einen ausgesprochen hohen Anteil an Seitenketten gekennzeichnet sind. In Abbildung 24 ist der Anteil an neutralen Seitenketten gegen den entsprechenden $x_{90,3}$ -Wert aufgetragen. Die Verteilung der Datenpunkte deutet über den gesamten ermittelten Bereich auf einen linearen Zusammenhang hin (R^2 : 0,71; Standardabweichung: 0,08). Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, dass die Pektine unter unterschiedlichsten Bedingungen extrahiert wurden und es dabei zu gleichzeitigen Veränderungen an einer Vielzahl an Strukturmotiven kommen konnte. Da jedes Strukturmotiv einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Einfluss auf die Emulgierereigenschaften haben kann und sich die verschiedenen Strukturen teilweise auch gegenseitig beeinflussen, deutet ein vergleichsweise eindeutiger Zusammenhang auf eine hohe Relevanz dieses Parameters für die Emulgierereigenschaften hin. Bemerkenswert ist auch, dass keine Ausreißer oder offensichtliche Sättigungseffekte beobachtet werden konnten.

Zur Spezifizierung der beobachteten Korrelation zwischen dem $x_{90,3}$ -Wert und dem Anteil an neutralen Seitenketten wurde zusätzlich der Einfluss der arabinosehaltigen bzw. galactosehaltigen Seitenketten separat untersucht.

4 Ergebnisse und Diskussion

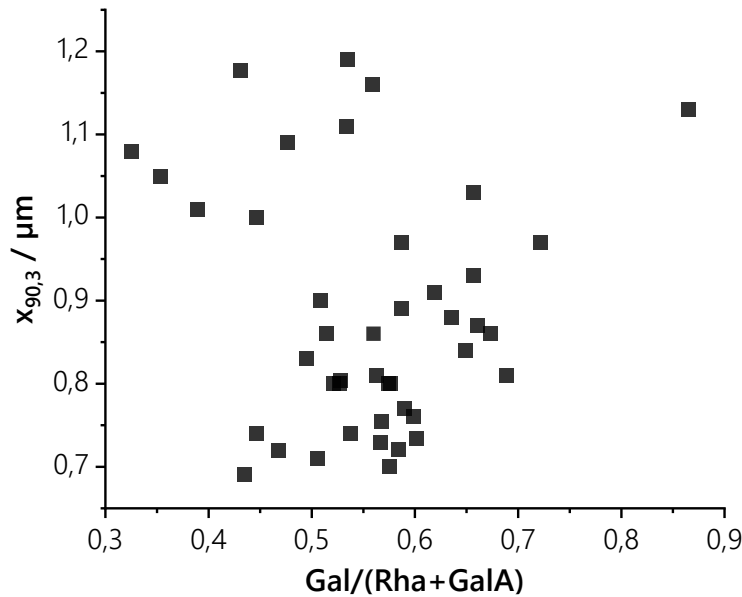


Abbildung 25: Auftragung der Verhältnisse der molaren Anteile an Galactose (Gal) zu den Summen der molaren Anteile an Rhamnose und Galacturonsäure (Rha+GalA) der 43 unterschiedlich extrahierten Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. Gal/(Rha+GalA) beschreibt das Verhältnis galactosehaltiger Seitenketten zum Pektinrückgrat. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

4.3.1.7 ANTEIL AN ARABINANSEITENKETTEN VS. $x_{90,3}$

Analog zur Untersuchung des Einflusses arabinosehaltiger Seitenketten auf die Emulgierereigenschaften werden die Verhältnisse von Arabinose (mol%) zur Summe von Rhamnose und Galacturonsäure (mol%) ermittelt. Mit Werten von etwa 0,1 - 1,6 ist hier eine breite Spanne zwischen arabinosearmen und -reichen Pektinen abgebildet. Die gebildeten Verhältnisse sind in Abbildung 26 gegen den $x_{90,3}$ -Wert aufgetragen. Die Verteilung der Datenpunkte verläuft ähnlich wie bei der Auftragung des Seitenketten-zu-Rückgrat Verhältnisses (Abbildung 24). Es ist ebenfalls ein linearer Trend hin zu größeren $x_{90,3}$ -Werten bei niedrigeren Anteilen an arabinosehaltigen Seitenketten zu erkennen, wobei die Verteilung der Datenpunkte noch einmal etwas enger ist (R^2 : 0,80; Standardabweichung: 0,07). Arabinosehaltige Seitenketten scheinen demnach ursächlich für die beobachtete Korrelation zwischen dem Seitenketten-zu-Rückgrat Verhältnis und dem $x_{90,3}$ -Wert zu sein.

Der vergleichsweise eindeutige Trend lässt vermuten, dass es auch einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Anteil arabinosehaltiger Seitenketten und den Emulgierereigenschaften von SBP gibt. Allerdings könnten auch Strukturveränderungen ursächlich für die gefundene Korrelation sein, die mit einer Verringerung des Gehalts an neutralen Seitenketten einhergehen. In erster Linie sind hier die Abnahme des M_w oder die Verringerung des Gehalts an *trans*-Ferulasäure zu nennen, da beide Parameter direkt durch partielle Hydrolysen der Arabinane bzw. allgemein der Neutralzuckerfraktion betroffen sind.

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

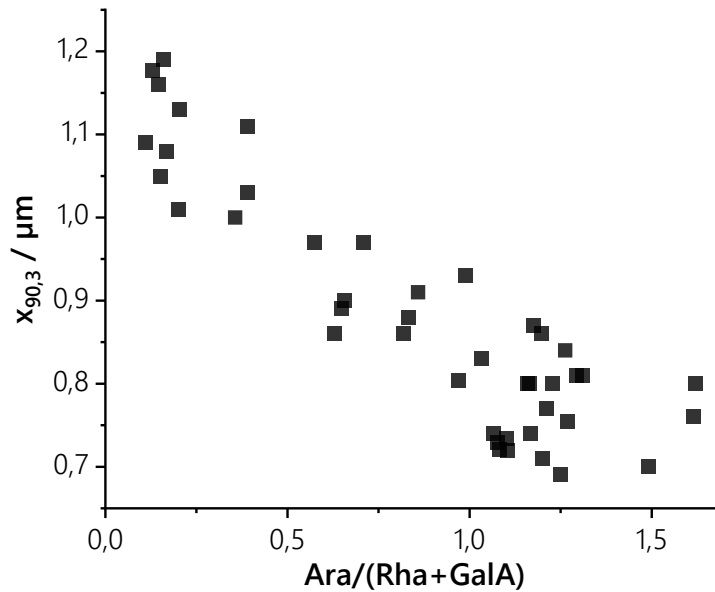


Abbildung 26: Auftragung der Verhältnisse der molaren Anteile an Arabinose (Ara) zu den Summen der molaren Anteile an Rhamnose und Galacturonsäure (Rha+GalA) der 43 unterschiedlich extrahierten Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. $Ara/(Rha+GalA)$ beschreibt das Verhältnis arabinosehaltiger Seitenketten zum Pektinrückgrat. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

4.3.1.8 MITTLERES MOLEKULARGEWICHT VS. $x_{90,3}$

Höhere M_w wirken sich zwar positiv auf die emulsionsstabilisierenden Eigenschaften von SBP aus, der Einfluss auf die initiale Emulsionstropfengröße ist jedoch nicht eindeutig geklärt (siehe Abschnitt 1.5.2).

Das M_w der in dieser Arbeit zur Aufstellung von Struktur-Eigenschaftskorrelationen untersuchten SBP deckte mit Werten von etwa 150 - 1200 kDa einen sehr weiten Bereich ab. Die Auftragung gegen die dazugehörigen $x_{90,3}$ -Werte ergibt eine breite und diffuse Verteilung (Abbildung 27). Für hohe M_w konnten zwar keine sehr hohen $x_{90,3}$ -Werte beobachtet werden, aber niedrige $x_{90,3}$ -Werte konnten sowohl bei hohen (900 kDa) als auch bei sehr niedrigen (200 kDa) M_w festgestellt werden. Erhöhte M_w scheinen demnach tendenziell positiv für die Emulgierwirkung zu sein, aber keine Voraussetzung. Die beobachtete Korrelation zwischen dem Anteil arabinosehaltiger Seitenketten und den Emulgiereigenschaften liegt damit nicht in der reinen Reduzierung des M_w begründet.

4 Ergebnisse und Diskussion

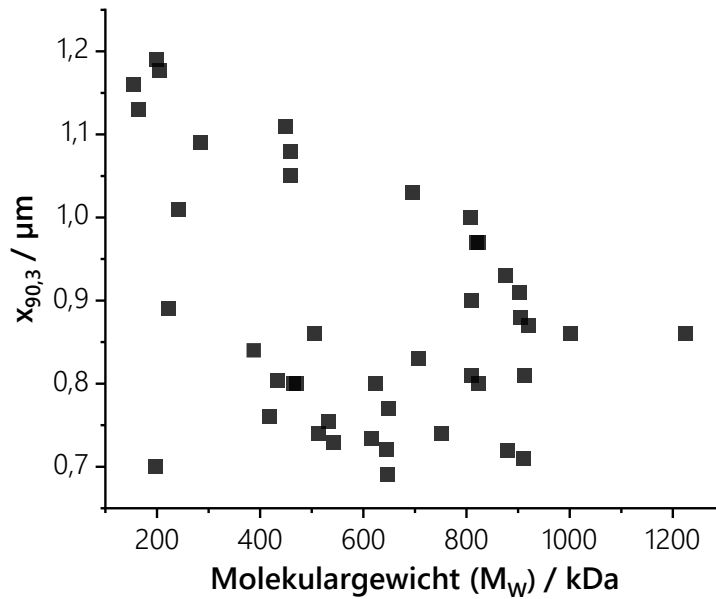


Abbildung 27: Auftragung der Molekulargewichte (Gewichtsmittel, M_w) der 43 unterschiedlich extrahierten Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

4.3.1.9 TRANS-FERULASÄUREGEHALT VS. $X_{90,3}$

Die Substitution der neutralen Seitenketten mit Ferulasäure stellt eine Besonderheit von SBP dar und wird oftmals mit den guten Emulgierereigenschaften in Verbindung gebracht (siehe Abschnitt 1.5.2). Bei den in dieser Arbeit untersuchten SBP ist für den Gehalt an *trans*-Ferulasäure keine eindeutige Korrelation zu den Emulgierereigenschaften ersichtlich (Abbildung 28). Tendenziell können zwar höhere *trans*-Ferulasäuregehalte mit niedrigeren $x_{90,3}$ -Werten in Verbindung gebracht werden, allerdings ist die Verteilung sehr breit gestreut. Zudem gibt es einzelne Pektine, die nicht diesem Schema entsprechen. So ermöglichte das Pektin mit dem geringsten gemessenen *trans*-Ferulasäuregehalt (509 mg/100 g) die Herstellung einer Emulsion mit einem der niedrigsten $x_{90,3}$ -Werte (0,70 μm), die im Zuge dieser Arbeit analysiert wurden. Demnach scheint es für den untersuchten Wertebereich keinen direkten bzw. alleinigen Zusammenhang zwischen dem *trans*-Ferulasäuregehalt und den Emulgierereigenschaften von SBP zu geben.

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgierereigenschaften

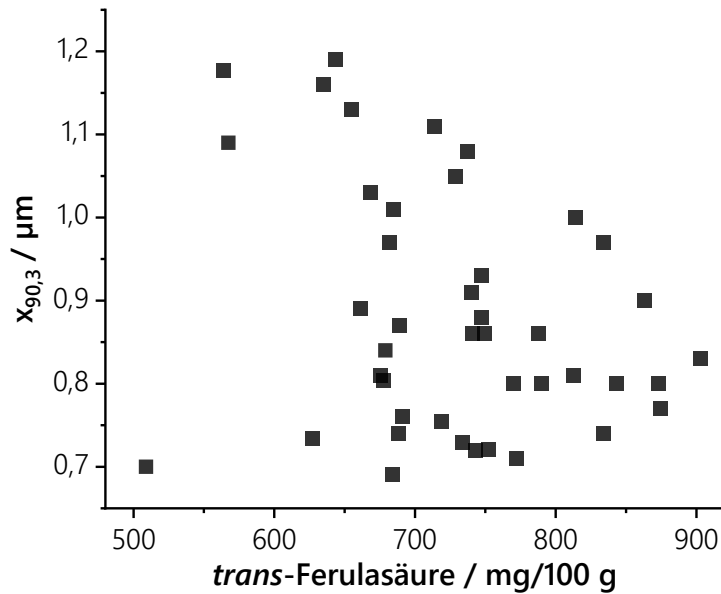


Abbildung 28: Auftragung der *trans*-Ferulasäuregehalte der 43 unterschiedlich extrahierten Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

4.3.2 STRUKTUR-EIGENSCHAFTSZUSAMMENHÄNGE AUTOKLAVENEXTRAHIERTER PEKTINE

Die diskutierten Struktur-Eigenschaftskorrelationen liefern eindeutige Hinweise, dass tatsächlich Arabinane den stärksten Einfluss auf die Emulgierereigenschaften von säureextrahierten SBP haben. Insbesondere die nicht kohärenten Zusammenhänge für das M_w und den *trans*-Ferulasäuregehalt bestärken diese Hypothese. Nichtsdestotrotz werden die Emulgierereigenschaften von SBP nicht allein durch den Anteil an Arabinanen bestimmt. Deutlich wird das an den bereits diskutierten autoklavenextrahierten Pektinen (pH 4,6; 20 - 60 min), die trotz durchweg hoher Arabinoseanteile grundlegend unterschiedliche Emulgierereigenschaften aufwiesen (Tabelle 27). Strukturell unterscheiden sich diese drei Pektine primär in ihrem M_w , sodass die Unterschiede in den Emulgierereigenschaften vermutlich maßgeblich hierauf zurückzuführen sind.

Der offensichtlich untergeordnete Einfluss des Anteils arabinosehaltiger Seitenketten hängt vermutlich mit dem im Vergleich zu säureextrahierten SBP bedeutend niedrigeren M_w der autoklavenextrahierten SBP zusammen. Durch die Bedingungen während der Autoklavenbehandlung (pH 4,6; 121 °C; 2 bar) werden insbesondere die Galacturonanregionen der entsprechenden Pektine fortwährend gespalten, sodass Pektineinheiten, die zuvor gegebenenfalls verknüpft vorlagen, getrennt werden können. Zur Ausübung phasenvermittelnder Eigenschaften ist es allerdings erforderlich, dass hydrophobere und hydrophilere Pektinmotive miteinander verbunden sind. Dementsprechend kann die mit zunehmender Extraktionszeit teils eklatante Verschlechterung der Emulgierereigenschaften indirekt mit der Abnahme des M_w erklärt werden. Allgemein können die abweichenden Struktur-Funktionalitätsbeziehungen darauf

4 Ergebnisse und Diskussion

zurückgeführt werden, dass durch die Autoklavenbehandlung mit HG andere Bereiche gespalten werden als im Zuge der Säureextraktion (v.a. Arabinane) und dementsprechend grundlegend unterschiedliche Polymere vorliegen.

Unter Miteinbeziehung von SBP, die durch Autoklavenextraktion unter Säurezugabe (pH 2,5 bzw. 3,5) gewonnen wurden, wird die Hypothese eines maßgeblichen Einflusses des M_w , und damit von zu säureextrahierten SBP unterschiedlichen Struktur-Eigenschaftsbeziehungen, bekräftigt. Bei Auftragung der M_w der bei unterschiedlichen pH-Milieus und verschiedenen Behandlungsdauern mittels Autoklavenextraktion gewonnenen SBP gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte kann ein Trend hin zu ansteigenden Tropfengrößen bei geringeren M_w beobachtet werden (Abbildung 29). Dabei kann sogar ein linearer Zusammenhang vermutet werden, wobei diese Schlussfolgerung aufgrund der geringen Probenzahl unter Vorbehalt steht. Lediglich das durch 60-minütige Autoklavenbehandlung (pH 4,6) extrahierte SBP weicht mit einem $x_{90,3}$ -Wert von 13,6 μm deutlich von der bei einer linearen Korrelation erwarteten Tropfengröße ab.

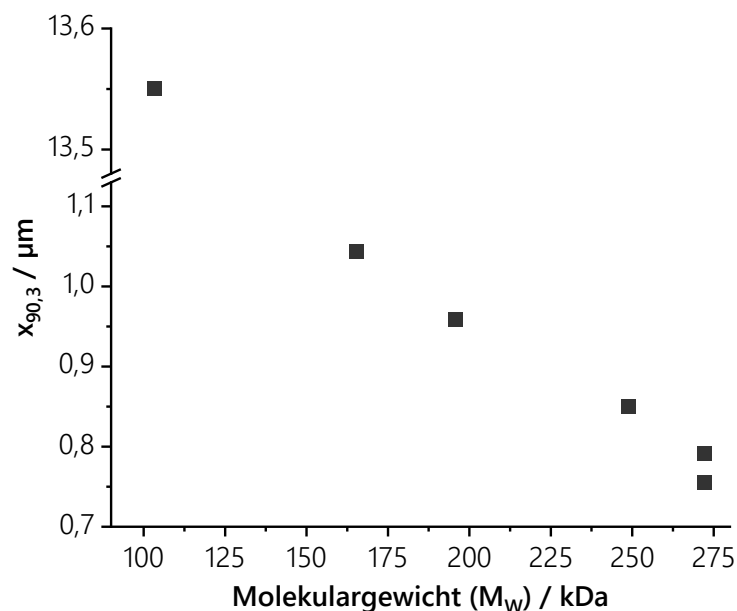


Abbildung 29: Auftragung der mittleren Molekulargewichte (Gewichtsmittel, M_w) verschiedener durch Autoklavenbehandlung (121 °C; pH 2,5 - 4,6; 20 - 60 min) extrahierter Zuckerrübenpektine gegen die entsprechenden $x_{90,3}$ -Werte. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

Dementsprechend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das M_w bei Autoklavenextraktionen, unabhängig von den exakten Prozessbedingungen, einen entscheidenden Einfluss auf die Emulgierereigenschaften hat. Im Gegensatz zu säureextrahierten SBP, bei denen im Bereich von etwa 150 - 1200 kDa kein Zusammenhang mit den Emulgierereigenschaften zu beobachten war, korrelieren bei den untersuchten autoklavenextrahierten SBP im deutlich engeren Bereich von etwa 150 - 300 kDa größere SBP mit kleineren stabilisierten Tropfengrößen. Zusätzlich zeigen das geringe M_w (100 kDa) sowie die gravierend schlechteren Emulgierereigenschaften ($x_{90,3}$: 13,6 μm) des durch 60-minütige Autoklavenbehandlung (pH 4,6) extrahierten SBP an, dass die Unterschreitung eines gewissen M_w

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgierereigenschaften

zu einer sprunghaften Verschlechterung der Emulgierereigenschaften führt. Neben der bereits diskutierten Separation hydrophober und hydrophiler Pektinmotive könnte dies auch auf die mit der geringeren Größe einhergehende verminderte sterische Stabilisation der Öltröpfchen zurückzuführen sein. Für säureextrahierte SBP wurde auch unter harschen Extraktionsbedingungen keine vergleichbare, schlagartige Verschlechterung der Emulgierereigenschaften beobachtet. Eine naheliegende Erklärung hierfür könnte sein, dass das M_w nicht in dem Ausmaß reduziert wurde, wie es bei der 60-minütigen Autoklavenextraktion der Fall war.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein möglichst intaktes Galacturonangrundgerüst als Bindeglied verschiedener Pektinelemente Voraussetzung für gute Emulgierereigenschaften zu sein scheint. Spaltungen des Pektinrückgrats wirken sich mit zunehmender Modifizierung stärker aus (siehe Abschnitt 4.2.3), vermutlich da die Wahrscheinlichkeit steigt, dass hydrophobe und hydrophile Fraktionen getrennt werden. Dementsprechend können auch die Emulgierereigenschaften von autoklavenextrahierten SBP vom M_w abgeleitet werden.

4.3.3 GEZIELTE MODIFIKATION DER PEKTINSTRUKTUR

Zur Überprüfung der aufgestellten Struktur-Eigenschaftsbeziehungen wurden verschiedene methodische Ansätze durchgeführt, die eine präzise Modifikation bestimmter Struktur motive zum Ziel hatten. Eine anschließende Analyse der Emulgierereigenschaften ermöglichte die nähere Spezifizierung des Einflusses einzelner definierter Strukturparameter auf die funktionalen Eigenschaften. Neben chemischen Methoden wurden die Strukturmodifikationen vor allem durch den Einsatz spezifischer Enzyme erreicht. Als Ausgangsmaterial für die gezielte Modifikation wurden Pektine ausgewählt, die unter vergleichsweise milden Bedingungen extrahiert wurden (80 °C; pH 2f; 1 h) und demnach eine lediglich geringfügig modifizierte Molekülstruktur aufweisen.

4.3.3.1 MODIFIKATION DES VERESTERUNGSGRADS DURCH CHEMISCHE ENTESTERUNG

In einem ersten Ansatz wurde der Veresterungsgrad der Pektine modifiziert. Hierzu wurde eine partielle Verseifung durch Behandlung mit schwacher Natronlauge durchgeführt. Bei alkalischen pH-Werten besteht bei hochveresterten Pektinen jedoch die Gefahr einer Spaltung des Galacturonanrückgrats durch β -Eliminierungsreaktionen. Zur weitgehenden Vermeidung dieser Reaktionen wurden Vorversuche durchgeführt, bei denen die Laugenkonzentration ermittelt wurde, die gerade ausreichend für eine partielle Verseifung ist. Zudem wurden die Pektine unter Eiskühlung behandelt, um das Auftreten von β -Eliminierungsreaktionen weiter zu minimieren (Albersheim *et al.* 1960). Zur Herstellung von Pektinen mit unterschiedlichen Veresterungsgraden wurden zwei Verseifungsreaktionen mit einer Laugekonzentration von 3 mmol NaOH/g SBP und einer Behandlungsdauer von 15 bzw. 180 min durchgeführt. Zur Beurteilung der Auswirkung der partiellen Entesterung wurden die modifizierten SBP mit dem

4 Ergebnisse und Diskussion

unmodifizierten Ausgangspektin verglichen. Die Ergebnisse zur strukturellen Zusammensetzung sowie den Emulgierereigenschaften sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Neben dem Methylierungs- und Acetylierungsgrad wurden auch der Gehalt an *trans*-Ferulasäure, das M_w , der Proteingehalt (Tabelle 13) sowie die Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharidfraktion (Abbildung 30) analysiert, um auszuschließen, dass anderweitige strukturelle Modifikationen vorliegen.

Tabelle 13: Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und $x_{90,3}$ -Werte (n = 3) von Zuckerrübenpektinen vor (Kontrollpektin, KP) und nach 15- bzw. 180-minütiger Entesterung mit 3 mmol NaOH/g Pektin unter Eiskühlung (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. DAc: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, *t*-FA: *trans*-Ferulasäuregehalt, M_w : Molekulargewicht (Gewichtsmittel), $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	Inkubationszeit / min		
	KP	15	180
$x_{90,3}$ (Tag 0) / μm	0,80 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	0,95 \pm 0,02
$x_{90,3}$ (Tag 30) / μm	0,80 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	0,98 \pm 0,02
M_w / kDa	470 \pm 15	457 \pm 4	425 \pm 18
Protein / %	4,6 \pm 0,1	4,8 \pm 0,1	4,8 \pm 0,1
DM / %	74,1 \pm 1,5	21,6 \pm 0,8	14,0 \pm 0,7
DAc / %	49,0 \pm 1,4	26,4 \pm 0,5	22,7 \pm 0,1
<i>t</i> -FA / mg/100 g	790 \pm 23	733 \pm 9	721 \pm 5

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe ist bei beiden Ansätzen eine deutliche Verringerung des Methylierungs- und Acetylierungsgrads zu sehen. Eine 15-minütige Laugenbehandlung resultierte in einer relativen Abnahme des Methylierungsgrads um etwa 71 % und des Acetylierungsgrads um etwa 46 %. Nach 180-minütiger Behandlung konnte eine weitere Verringerung der Veresterungsgrade beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollprobe wurde der Methylierungsgrad um etwa 81 % und der Acetylierungsgrad um etwa 54 % reduziert. Der *trans*-Ferulasäuregehalt verringerte sich hingegen nur leicht durch die basische Hydrolyse, unabhängig von der Behandlungsdauer. Demnach weisen die an verschiedenen Ester unterschiedliche Stabilitäten gegenüber basischen Bedingungen auf, die sich bei geringen Laugenkonzentrationen deutlich bemerkbar machen. Unter den gegebenen Bedingungen wurde der Proteingehalt der Pektine ebenfalls nicht beeinflusst. Beim M_w ist eine geringe Abnahme mit zunehmender Behandlungsdauer erkennbar (Kontrolle: 470 kDa; nach 180 min basischer Hydrolyse: 430 kDa). Diese Verringerung lässt sich zum Teil durch die Freisetzung von Methanol bzw. Essigsäure im Zuge der Verseifung erklären, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass vermehrt β -Eliminierungsreaktionen innerhalb der HG-Abschnitte aufgetreten sind. Dafür spricht auch, dass im Vergleich zur Kontrollprobe keine höhere Absorption bei einer Wellenlänge von 235 nm gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Ein Anstieg dieser Absorption wäre ein Indiz für

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

erhöhte Konzentrationen ungesättigter Verbindungen, die durch β -Eliminierung von methylveresterten Galacturonsäuren entstehen (Albersheim *et al.* 1960). Anhand der Monosaccharidzusammensetzung konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Polysaccharide durch das erneute Lösen, die Laugenbehandlung sowie das erneute Ausfällen nur in geringem Umfang modifiziert wurde (Abbildung 30).

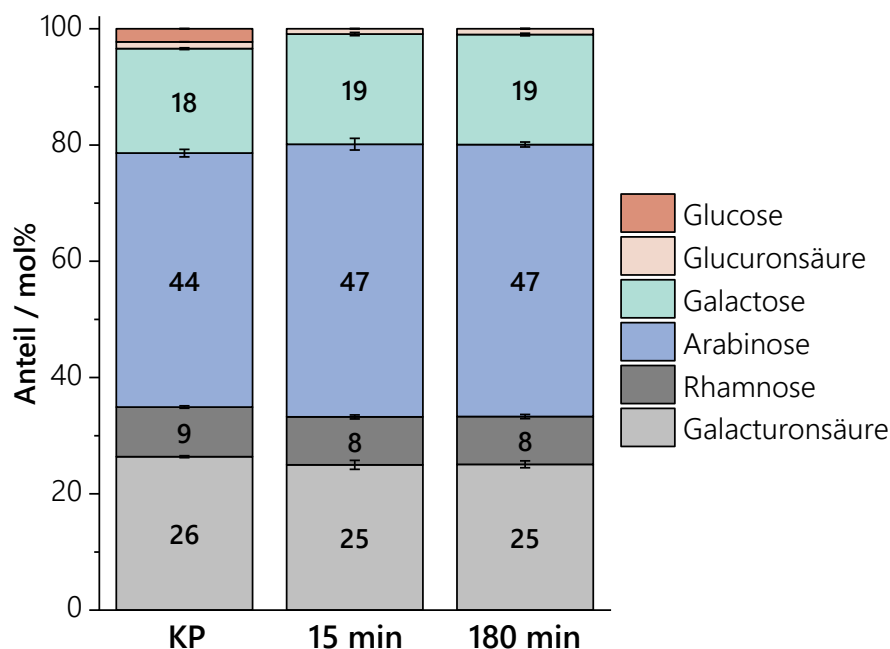


Abbildung 30: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen vor (Kontrollpektin, KP) und nach 15- bzw. 180-minütiger Entesterung mit 3 mmol NaOH/g Pektin unter Eiskühlung, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3)

Die Emulgiereigenschaften der mit Natronlauge behandelten Proben verschlechterten sich im Vergleich zur Kontrollprobe ($x_{90,3}$: 0,80 μm), die für unterschiedliche Zeiträume behandelten Proben unterschieden sich allerdings nicht in den ermittelten $x_{90,3}$ -Werten (jeweils 0,95 μm). Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den für den Methylierungs- und Acetylierungsgrad beobachteten Struktur-Eigenschaftskorrelationen (Abschnitt 4.3.1.2 und Abschnitt 4.3.1.3), wonach sich hohe Substitutionsgrade tendenziell positiv auf die Emulgiereigenschaften auswirken. Die Veresterungsgrade scheinen jedoch nicht der primäre Faktor für die Eigenschaften zu sein, denn trotz stark verringerter Methylierungs- (19 % des Kontrollwerts) und Acetylierungsgrade (46 % des Kontrollwerts) konnten noch Emulsionen mit $x_{90,3}$ -Werten unter 1 μm stabilisiert werden. Demzufolge bestätigen die erhaltenen Ergebnisse, dass andere Strukturmerkmale einen größeren Einfluss auf die Emulgiereigenschaften haben als der Methylierungs- und Acetylierungsgrad. Darüber hinaus scheint die partielle Verseifung keinen bedeutenden Einfluss auf die Emulsionsstabilität zu haben, da bei beiden mit Natronlauge behandelten Proben kein merklicher Anstieg der Tropfengröße nach 30 Tagen Lagerung festzustellen ist (Tabelle 13).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist allerdings zu beachten, dass das Ausgangspektin, im Gegensatz zu den laugenbehandelten Pektinen, nicht erneut gelöst, ausgefällt und getrocknet

4 Ergebnisse und Diskussion

wurde. Dieser zusätzliche Aufarbeitungsprozess könnte in geringfügigen Änderungen der Polymerstruktur resultieren, die sich wiederum auf die Emulgierereigenschaften auswirken könnten. Beispielsweise könnte die Temperatureinwirkung im Zuge des Trocknungsprozesses zur Ausbildung neuer Verknüpfungen und damit zu einer möglichen Änderung des Lösungsverhaltens einzelner Moleküle bzw. Aggregate führen (Wang *et al.* 2021). Darüber hinaus muss beachtet werden, dass sich bei den laugenbehandelten Pektinen durch die partielle Verseifung sowohl die Wechselwirkungen der Polymere untereinander als auch die Wechselwirkungen zwischen den Pektinen und dem Lösungsmittel verändern können. Dadurch könnte es unter anderem zur Bildung schlecht löslicher Aggregate oder zu verbesserter Löslichkeit zuvor schwer löslicher Strukturkomplexe kommen. Dies könnte sich wiederum auf Strukturparameter wie M_w und auf die funktionellen Eigenschaften auswirken. Auch wenn diese Effekte nicht auszuschließen sind, wirken sie sich jedoch vermutlich nur geringfügig auf Struktur und Eigenschaften der untersuchten Pektine aus. Dafür spricht, dass bei den alkalibehandelten Proben im Vergleich zur Kontrollprobe strukturell fast ausschließlich Unterschiede im Veresterungsgrad auszumachen waren. Insbesondere die lediglich geringfügige Abnahme des M_w , die zum Teil auf die Abspaltung von Methanol und Essigsäure zurückzuführen ist, ist ein Indiz dafür, dass die Auswirkungen des erneuten Lösens und Ausfällens bei der Interpretation der Ergebnisse vernachlässigt werden können.

4.3.3.2 ENZYMATISCHE MODIFIKATION VERSCHIEDENER STRUKTURELEMENTE

Die Überprüfung der Zusammenhänge zwischen den weiteren Strukturmotiven und den Emulgierereigenschaften erfolgte mithilfe enzymatischer Modifikationen. Hierfür wurden zunächst kommerzielle Enzyme mit hoher Reinheit eingesetzt, die spezifische Modifikationen der Arabinan- (*endo*- α -1,5-L-Arabinanase), Galactan- (*endo*- β -1,4-D-Galactanase), Protein- (Subtilisin A) bzw. HG-Fraktion (PGA) oder eine Verringerung des Ferulasäuregehalts (Ferulasäureesterase) bewirken sollten. Während letztgenanntes Enzym die Abspaltung von an Arabinose oder Galactose gebundenen Ferulasäuresubstituenten bewirken soll, hat der Proteaseinsatz eine Reduzierung des Proteingehalts zum Ziel. *endo*- α -1,5-L-Arabinanase und *endo*- β -1,4-D-Galactanase rufen zufällige Spaltungen innerhalb der Arabinan- bzw. Galactanhauptkette hervor. Die Abspaltung oligomerer Arabinane und Galactane führt zu niedrigeren Anteilen der jeweiligen Struktur motive der neutralen Seitenketten am Gesamtpektin. Der Einsatz von PGA hat wiederum die Spaltung des Galacturonanrückgrats zwischen nicht-veresterten Galacturonsäureeinheiten zum Ziel, die in einer Verringerung des M_w resultierten sollte.

Die Enzyme wurden in moderaten Konzentrationen eingesetzt, um einen Überblick zu den Auswirkungen auf die Eigenschaften zu erhalten und die Auswirkungen möglicher Nebenaktivitäten der Enzympräparate zu minimieren. Für die Inkubationen wurde ein pH-Wert von 6 gewählt, um eine Aktivität aller Enzym zu gewährleisten. Eine Inkubation bei diesem vergleichsweise hohen pH-Wert könnte sich, ebenso wie das erneute Lösen und Ausfällen, bereits auf die Pektinstruktur auswirken. Daher wurde ein Kontrollansatz ohne Enzymzugabe mitgeführt.

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

Die Ergebnisse zur strukturellen Zusammensetzung sowie den Emulgiereigenschaften der enzymatisch modifizierten SBP sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und $x_{90,3}$ -Werte (n = 3) von Zuckerrübenpektinen nach unterschiedlicher enzymatischer Modifikation (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Zur enzymatischen Modifikation wurden *endo*- α -1,5-L-Arabinanase (AA, 5 U/g), *endo*- β -1,4-D-Galactanase (GA, 10 U/g), Subtilisin A Protease (PROT, 18 U/g), Ferulasäureesterase (FAE, 0,05 U/g) und *endo*- α -1,4-D-Polygalacturonase (PGA, 5 U/g) eingesetzt. Alle Inkubationen erfolgten bei pH 6 und 40 °C für 24 h bzw. 1 h (PGA). Die Kontrollprobe (KP) wurde ohne Enzymzugabe unter ansonsten identischen Bedingungen aufgearbeitet. M_w : Molekulargewicht (Gewichtsmittel), *t*-FA: *trans*-Ferulasäure, n.b.: nicht bestimmt

	KP	AA	GA	PROT	FAE	PGA
$x_{90,3}$ (Tag 0) / μm	0,76 \pm 0,02	0,94 \pm 0,01	0,78 \pm 0,02	0,79 \pm 0,01	0,77 \pm 0,02	0,71 \pm 0,01
$x_{90,3}$ (Tag 30) / μm	0,76 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	0,78 \pm 0,02	0,80 \pm 0,01	0,77 \pm 0,01	0,70 \pm 0,02
M_w / kDa	758 \pm 6	503 \pm 26	574 \pm 20	743 \pm 7	747 \pm 21	660 \pm 5
Protein / %	5,1 \pm 0,1	5,6 \pm 0,1	4,5 \pm 0,2	4,0 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1
<i>t</i> -FA / mg/100 g	740 \pm 4	686 \pm 2	n.b.	n.b.	728 \pm 21	n.b.

Die Inkubation mit Ferulasäureesterase bewirkte keine Veränderung des $x_{90,3}$ -Werts, des Proteingehalts, des M_w (Tabelle 14) oder der Monosaccharidzusammensetzung (Abbildung 31). Allerdings kann auch im Vergleich zur Kontrollprobe keine deutliche Verringerung des Ferulasäuregehalts festgestellt werden. Demnach kann anhand des durchgeführten Ansatzes keine Aussage über den Einfluss des *trans*-Ferulasäuregehalts auf die Emulgiereigenschaften getroffen werden. Neben einer zu geringen Konzentration kann die marginale Reduzierung des Ferulasäuregehalts vermutlich auf eine mangelnde Aktivität des Enzyms gegenüber polymergebundener Ferulasäure zurückzuführen sein. Insbesondere die Komplexität der Arabinan- und AG-I-Motive könnte die Aktivität des Enzyms hemmen. Der Proteaseverdau bewirkte eine Verringerung des Proteingehalts, während das M_w (Tabelle 14) und die Monosaccharidzusammensetzung (Abbildung 31) vergleichbar mit der Kontrollprobe sind. Da auch die durchschnittliche stabilisierte Tropfengröße nur marginal zugenommen hat, ist von keinem entscheidenden Einfluss des Proteingehalts auf die Emulgiereigenschaften auszugehen. Diese Beobachtung bestätigt die bisherigen Schlüsse zum Einfluss des Proteingehalts, der im Bereich > 2 % keinen positiven Einfluss zu haben scheint. Die Inkubation mit der ausgewählten Galactanase bewirkte eine Reduktion des Anteils an Galactose an der Monosaccharidverteilung von etwa 19 auf 14 mol% (Abbildung 31) sowie eine Verringerung des M_w (Tabelle 14). Die Emulgiereigenschaften wurden durch die Modifikation jedoch nicht negativ beeinflusst, weshalb der untergeordnete Einfluss des Galactananteils bestätigt werden kann. Allerdings muss beachtet werden, dass bei diesem Versuchsansatz lediglich der Anteil β -1,4-verknüpfter Galactane verringert wurde. Über β -1,3-, β -1,6- und β -1,3,6-verknüpfte Galactane und damit auch über den Einfluss der AG-II Motive von SBP können keine Aussagen getroffen werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

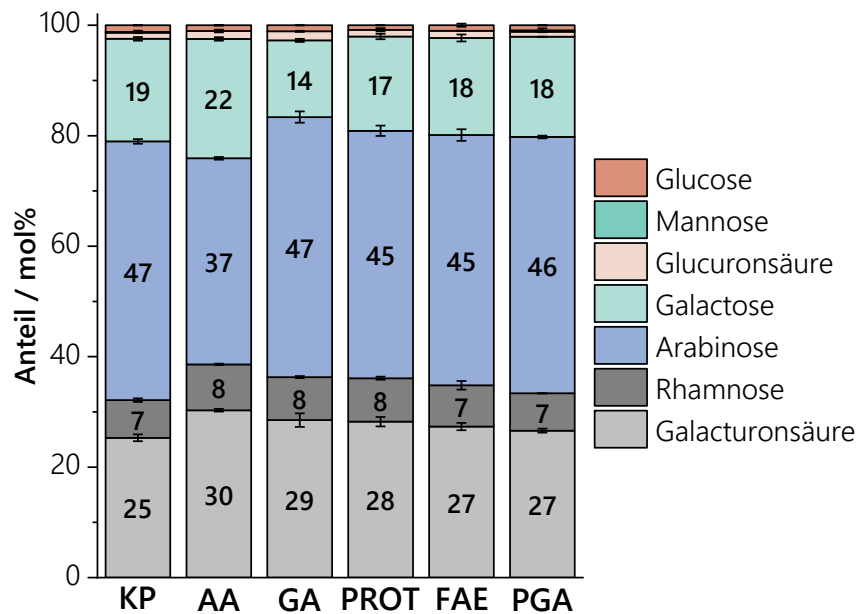


Abbildung 31: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen nach unterschiedlichen enzymatischen Modifikationen, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse ($n = 3$). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Zur enzymatischen Modifikation wurden *endo*- α -1,5-L-Arabinanase (AA, 5 U/g), *endo*- β -1,4-D-Galactanase (GA, 10 U/g), Subtilisin A Protease (PROT, 18 U/g), Ferulasäureesterase (FAE, 0,05 U/g) und *endo*- α -1,4-D-Polygalacturonase (PGA, 5 U/g) eingesetzt. Alle Inkubationen erfolgten bei pH 6 und 40 °C für 24 h bzw. 1 h (PGA). Die Kontrollprobe (KP) wurde ohne Enzymzugabe unter ansonsten identischen Bedingungen bearbeitet

Im Gegensatz zum Galactanverbau konnte beim arabinanmodifizierten Pektin eine Verschlechterung des $x_{90,3}$ -Werts im Vergleich zur Kontrollprobe festgestellt werden (0,94 μm ; Kontrollprobe: 0,76 μm). Strukturell konnte neben einer moderaten Verringerung des Arabinoseanteils (47 mol% zu 37 mol%, Abbildung 31) erwartungsgemäß auch eine Verringerung des M_w und des *trans*-Ferulasäuregehalts festgestellt werden (Tabelle 14). Die strukturelle Zusammensetzung zeigt daher an, dass die Inkubation mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase Spaltungen innerhalb der Arabinanfraktion und keine unerwünschten Modifikationen anderer Strukturelemente bewirkt hat. Dementsprechend kann die aus den Struktur-Eigenschaftskorrelationen hervorgegangene Hypothese bestärkt werden, dass Arabinanstrukturen einen bedeutenden Anteil an den guten Emulgiereigenschaften von SBP haben. Allerdings könnte die Verschlechterung der Emulgiereigenschaften durch die Abspaltung von Arabinoseoligomeren auch auf die einhergehende Verringerung des M_w oder des *trans*-Ferulasäuregehalts zurückgeführt werden. Gegen das M_w als ursächlichen Strukturparameter spricht jedoch, dass beim Verbau mit PGA trotz verringertem M_w sogar eine leichte Verbesserung der Eigenschaften beobachtet werden konnte ($x_{90,3}$: 0,71 μm ; Kontrollprobe: 0,76 μm , Tabelle 14). Die im Vergleich zur Kontrollprobe ähnliche Monosaccharidzusammensetzung zeigt an, dass es hierbei tatsächlich nur zu vereinzelt Spaltungen des Galacturonanrückgrats gekommen ist und andere Strukturelemente nicht modifiziert wurden. Allerdings wurde das M_w bei diesem Ansatz in einem geringeren Maße reduziert als bei der Inkubation mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase.

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

Inwiefern sich eine vergleichbare Reduzierung des M_w durch eine fortwährende Spaltung des Galacturonanrückgrats auswirken würde, ist unklar.

Zur näheren Spezifizierung des Einflusses der Arabinanstrukturen und des M_w wurden zusätzliche Enzyminkubationen mit arabinan- und galacturonanspaltenden Präparaten durchgeführt.

4.3.3.3 ENZYMATISCHE MODIFIKATION DER ARABINANFRAKTION

Für eine detailliertere Untersuchung von Pektinen nach einer partiellen Hydrolyse der Arabinane wurde neben dem Enzym *endo*- α -1,5-L-Arabinanase auch eine α -L-Arabinofuranosidase eingesetzt. α -L-Arabinofuranosidase spaltet vornehmlich endständige Arabinofuranoseeinheiten ab. Da der größte Anteil der terminalen Arabinoseeinheiten an Verzweigungen vorliegt, wird bei der Hydrolyse mit α -L-Arabinofuranosidase ein verstärkter Abbau der verzweigten Arabinanstrukturen erwartet. Dementsprechend können Rückschlüsse über den Zusammenhang zwischen dem Verzweigungsgrad und den Emulgiereigenschaften gezogen werden. Um einen stufenweisen Verlauf der Arabinandegradation abzubilden, wurde für beide Enzyme jeweils eine Inkubation mit 10 U/g und mit 40 U/g Pektin durchgeführt. Die erhöhte Enzymaktivität (40 U/g) wurde gewählt, um eine möglichst vollständige Spaltung der jeweiligen Arabinanfraktionen zu erzielen. Die Inkubation mit 10 U/g hatte hingegen lediglich eine partielle Spaltung der Arabinanstrukturen zum Ziel. Zusätzlich zu den Enzyminkubationen wurde eine Kontrollprobe ohne Enzymzugabe aufgearbeitet. Alle Inkubationen erfolgten bei 40 °C und pH 4 für 24 h. Zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der enzymatisch modifizierten Pektine wurden die Monosaccharidzusammensetzung (Abbildung 32), das M_w , der Gehalt an *trans*-Ferulasäure sowie die Emulgiereigenschaften (Tabelle 15) analysiert.

Der Arabinoseanteil der enzymatisch behandelten Pektine verringerte sich im Vergleich zur Kontrollprobe deutlich, wobei der Verdau mit α -L-Arabinofuranosidase zu einer stärkeren Verringerung des Arabinoseanteils führte als der Verdau mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da, wie bereits in Abschnitt 4.2.2.2 diskutiert, mild säureextrahierte Pektine durch hochverzweigte Arabinanstrukturen gekennzeichnet sind und somit eine Vielzahl an Angriffspunkten für die eingesetzte α -L-Arabinofuranosidase bieten. Theoretisch sollten durch die Verringerung des Arabinoseanteils im Zuge der Enzyminkubation die Anteile der anderen Monosaccharide proportional zunehmen. Auffällig ist jedoch, dass der Anteil an Galacturonsäure, unabhängig vom eingesetzten Enzym, in Relation stets etwas stärker anstieg als die Anteile an Galactose und Rhamnose. Beispielhaft kann dies anhand der mit 40 U α -L-Arabinofuranosidase/g behandelten Probe (AF40) gezeigt werden. Im Vergleich zur Kontrollprobe wurde ein um 85 % höherer Galacturonsäureanteil ermittelt, während die Anteile an Rhamnose und Galactose lediglich um 53 % bzw. 42 % anstiegen. Nichtsdestotrotz ist nicht davon auszugehen, dass es durch die Enzyminkubationen zu unerwünschten Modifikationen der Galactan- oder RG-Fractionen gekommen ist, da dieser Trend sowohl für die mit α -L-Arabinofuranosidase als auch die mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase modifizierten Pektine zu beobachten war.

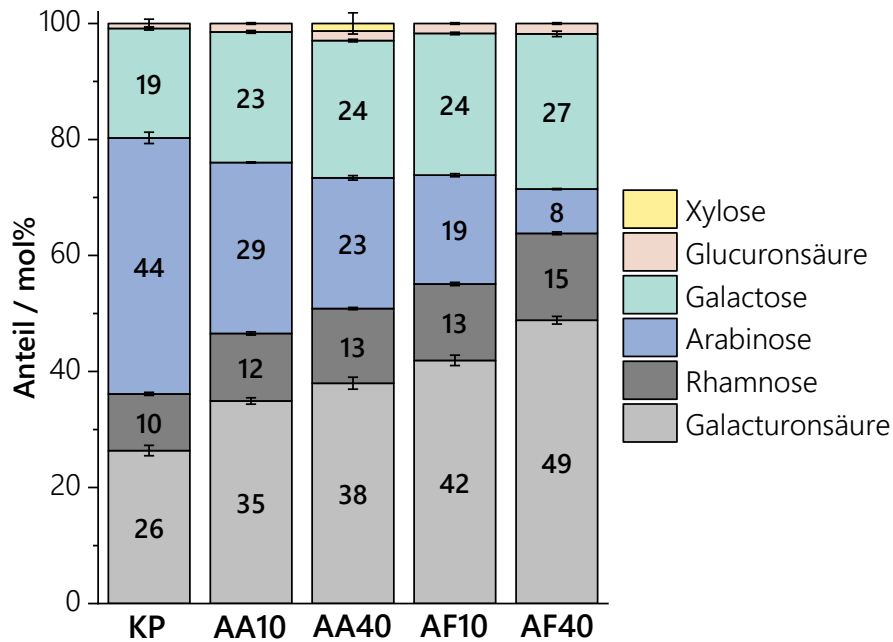


Abbildung 32: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen nach enzymatischer Modifikation mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase (AA10: 10 U/g; AA40: 40 U/g) und α -L-Arabinofuranosidase (AF10: 10 U/g; AF40: 40 U/g), bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Der enzymatische Verdau erfolgte bei pH 4 und 40 °C für 24 h. Die Kontrollprobe (KP) wurde ohne Enzymzugabe unter ansonsten identischen Bedingungen bearbeitet

Demnach sind die beobachteten Veränderungen der Pektinstruktur und insbesondere des M_w auf die jeweiligen Modifikationen der Arabinanfraktion zurückzuführen (Tabelle 15). Für die modifizierten Pektine konnten mit zunehmenden Arabinanabbau geringere M_w festgestellt werden. Die Verringerung des M_w ist bei den mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase behandelten Proben sowohl bei 10 U/g (AA10) als auch bei 40 U/g (AA40) moderat. Auch das mit 10 U/g α -L-Arabinofuranosidase behandelte SBP (AF10) weist, analog zu den ähnlich hohen Arabinoseanteilen, ein zur Probe AA40 vergleichbares M_w auf. Eine auffällig starke Abnahme des M_w ist jedoch zwischen den mit unterschiedlichen Aktivitäten an α -L-Arabinofuranosidase behandelten Pektinen ersichtlich. Mit 183 kDa ist das M_w des mit 40 U/g behandelten SBP (AF40) nur noch etwa halb so hoch wie das M_w von AF10 (379 kDa).

Die mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase behandelten Proben wiesen erwartungsgemäß im Vergleich zur Kontrollprobe mit ansteigender Enzymaktivität zunehmend niedrigere *trans*-Ferulasäuregehalte auf (AA10: -9 %; AF40: -19 %), was auf die Abspaltung ferulasäurehaltiger Arabinan oligosaccharide durch die induzierten zufälligen Spaltungen der Arabinanhauptkette zurückzuführen ist. Der *trans*-Ferulasäuregehalt der Probe AF10 ist hingegen identisch zur Kontrollprobe. Bei der erhöhten α -L-Arabinofuranosidasekonzentration (AF40) konnte jedoch eine Verringerung des *trans*-Ferulasäuregehalts beobachtet werden (-12 %). Da AF40 im Vergleich zu AF10, wie bereits diskutiert, auch ein deutlich niedrigeres M_w aufweist, könnte eine nicht-erwünschte *endo*- α -1,5-L-Arabinanase-Aktivität des α -L-Arabinofuranosidase Präparats zum Tragen gekommen sein. Die im Vergleich zu AA10 bzw. AA40 deutlichere Reduktion des M_w

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

könnte damit erklärt werden, dass die Arabinankette bei AF40 durch α -L-Arabinofuranosidase weitgehend linearisiert vorliegt und demnach eine geringere Hinderung der *endo*- α -1,5-L-Arabinanase-Aktivität durch verzweigte Arabinoseeinheiten gegeben ist. Die Verringerung des *trans*-Ferulasäuregehalts könnte allerdings auch auf eine nicht spezifizierte Aktivität des Enzyms gegenüber ferulasäuresubstituierten Arabinofuranoseeinheiten zurückzuführen sein, was bereits für aus anderen Organismen gewonnene α -L-Arabinofuranosidasen an Arabinoxylanen gezeigt werden konnte (Schendel *et al.* 2016).

Tabelle 15: Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und $x_{90,3}$ -Werte (n = 3) von Zuckerrübenpektinen nach enzymatischer Modifikation mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase (AA10: 10 U/g; AA40: 40 U/g) und α -L-Arabinofuranosidase (AF10: 10 U/g; AF40: 40 U/g) (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Der enzymatische Verdau erfolgte bei pH 4 und 40 °C für 24 h. Die Kontrollprobe (KP) wurde ohne Enzymzugabe unter ansonsten identischen Bedingungen bearbeitet. M_w : Molekulargewicht (Gewichtsmittel), *t*-FA: *trans*-Ferulasäure

	KP	AA10	AA40	AF10	AF40
$x_{90,3}$ (Tag 0) / μm	0,82 \pm 0,01	0,96 \pm 0,01	1,05 \pm 0,01	0,94 \pm 0,01	1,20 \pm 0,01
$x_{90,3}$ (Tag 30) / μm	0,83 \pm 0,01	0,97 \pm 0,01	1,09 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	1,28 \pm 0,06
M_w / kDa	529 \pm 27	467 \pm 12	392 \pm 14	379 \pm 9	183 \pm 5
<i>t</i> -FA / mg/100 g	742 \pm 11	673 \pm 8	604 \pm 15	741 \pm 2	651 \pm 2

Die ermittelten $x_{90,3}$ -Werte verschlechterten sich bei allen enzymatisch behandelten Proben in Relation zur Kontrollprobe. Zudem konnte für beide Enzyme eine Erhöhung der mittleren Tropfengröße bei erhöhter Enzymaktivität beobachtet werden. Bei den mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase inkubierten Pektinen erhöhten sich die mittleren Tropfengrößen sukzessive und in Übereinstimmung mit verringerten Arabinoseanteilen, *trans*-Ferulasäuregehalten und M_w . Die Änderungen des M_w und des *trans*-Ferulasäuregehalts sind jedoch im Vergleich zur relativen Verringerung des Arabinoseanteils nur gering bis moderat. Wie aus den in Abschnitt 4.3.1.8 bzw. 4.3.1.9 diskutierten Struktur-Eigenschaftskorrelationen ersichtlich ist, haben geringfügige Änderungen dieser Parameter vermutlich keinen merklichen Effekt auf die Emulgiereigenschaften. Daher deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Änderung der Eigenschaften auf den Einfluss der Arabinanstrukturen an sich zurückzuführen ist. Bei den mit α -L-Arabinofuranosidase inkubierten Pektinen konnte bei der geringeren Enzymaktivität (AF10) eine Abnahme des Arabinoseanteils, des M_w und des $x_{90,3}$ -Werts festgestellt werden. Der *trans*-Ferulasäuregehalt ist hingegen beinahe identisch zu dem Gehalt in der Kontrollprobe. Diese Beobachtung bestärkt die in Abschnitt 4.3.1.9 diskutierte Hypothese eines untergeordneten Einflusses des *trans*-Ferulasäuregehalts auf die Emulgiereigenschaften. Allerdings scheint auch der Arabinoseanteil nicht der alleinig ausschlaggebende Parameter zu sein, da bei AF10 trotz des stark reduzierten Anteils von 19 mol% lediglich eine vergleichsweise moderate Verschlechterung der Eigenschaften eingetreten ist. Ähnliche Emulgiereigenschaften konnten auch für AA10 mit einem Arabinoseanteil von 29 mol% bestimmt werden. AA40 weist ebenfalls einen höheren Arabinoseanteil als AF10 auf

4 Ergebnisse und Diskussion

(23 mol%), ist aber durch schlechtere Emulgierereigenschaften gekennzeichnet. Eine mögliche Erklärung für diese beiden Beobachtungen könnte die Arabinanarchitektur der unterschiedlich modifizierten SBP sein. Um den Einfluss des Verzweigungsgrads und der Kettenlänge der Arabinane zu untersuchen, wurden die glykosidischen Bindungsverhältnisse der enzymatisch modifizierten Pektine mittels Methylierungsanalyse bestimmt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Anteile der glykosidischen Bindungen (mol%) der enzymatisch mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase (AA10: 10 U/g; AA40: 40 U/g) bzw. α -L-Arabinofuranosidase (AF10: 10 U/g; AF40: 40 U/g) modifizierten Pektine, bestimmt mittels Methylierungsanalyse (n = 2). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Der enzymatische Verdau erfolgte bei pH 4 und 40 °C für 24 h. Die Kontrollprobe (KP) wurde ohne Enzymzugabe unter ansonsten identischen Bedingungen bearbeitet. Auszugsweise Darstellung der Mittelwerte (n = 2) der Arabinose-, Galactose- und Rhamnosebindungstypen. Für die vollständige Tabelle (inkl. Range/2) wird auf den Anhang verwiesen (Tabelle 33). Die Anteile sind bezogen auf die Gesamtheit aller Bindungstypen (%Ges) sowie auf den Anteil am jeweiligen Monosaccharid (%Ara, %Gal, %Rha) dargestellt. AA: *endo*- α -1,5-L-Arabinanase, AF: α -L-Arabinofuranosidase, Ara: Arabinose, f: Furanose, Gal: Galactose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, t: terminal

Glykosidische Bindungstypen	KP		AA10		AA40		AF10		AF40		
	%Ges	%Ara	%Ges	%Ara	%Ges	%Ara	%Ges	%Ara	%Ges	%Ara	
Ara	t-Araf	28,0	36,7	26,4	41,7	24,6	44,6	8,7	19,3	7,1	31,0
	t-Arap	0,5	0,7	0,7	1,1	0,8	1,5	1,1	2,4	1,8	7,9
	1,2-Araf	0,7	0,9	1,0	1,6	1,4	2,5	1,5	3,3	1,7	7,4
	1,3-Araf	1,8	2,4	2,0	3,2	1,7	3,1	0,9	2,0	1,4	6,1
	1,5-Araf	22,5	29,5	15,5	24,5	13,3	24,1	29,7	66,0	9,8	42,8
	1,3,5-Araf	17,3	22,7	12,0	19,0	8,0	14,5	1,7	3,8	0,8	3,5
	1,2,5-Araf	1,8	2,4	2,1	3,3	2,7	4,9	0,7	1,6	0,2	0,9
	1,2,3,5-Araf	3,6	4,7	3,6	5,7	2,6	4,7	0,7	1,6	0,1	0,4
	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	%Ges	%Gal	
Gal	t-Galp	4,0	25,2	6,7	27,1	8,4	27,0	10,7	32,1	17,3	34,7
	1,3-Galp	1,6	10,1	2,3	9,3	2,8	9,0	1,7	5,1	1,2	2,4
	1,4-Galp	4,6	28,9	7,1	28,7	9,3	29,9	10,1	30,3	15,8	31,7
	1,6-Galp	2,6	16,4	3,8	15,4	4,6	14,8	7,0	21,0	11,3	22,6
	1,2,4-Galp	0,2	1,3	0,3	1,2	0,4	1,3	0,3	0,9	0,7	1,4
	1,3,4-Galp	0,4	2,5	0,7	2,8	1,0	3,2	0,9	2,7	1,4	2,8
	1,3,6-Galp	2,5	15,7	3,8	15,4	4,6	14,8	2,6	7,8	2,2	4,4
	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	%Ges	%Rha	
Rha	1,2-Rhap	2,1	45,7	3,3	45,2	3,9	42,9	4,9	45,0	7,8	45,1
	1,2,4-Rhap	2,5	54,3	4,0	54,8	5,2	57,1	6,0	55,0	9,5	54,9

In der Arabinanfraktion der mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase behandelten Proben ist bei beiden Enzymaktivitäten ein ähnlicher Trend bei den glykosidischen Bindungsverhältnissen erkennbar. Der stärkste Rückgang ist bei den 1,5- und 1,3,5-verknüpften Arabinoseeinheiten zu beobachten, was auf die durch die zufällige Spaltung der Arabinanhauptkette bedingte Freisetzung von (verzweigte) Arabinan oligosacchariden zurückzuführen ist. Allerdings sind auch nach 24 h Inkubation mit 40 U/g noch 13,3 mol% 1,5-verknüpfte Arabinose bzw. 8,0 mol% 1,3,5-verknüpfte

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

Arabinose vorzufinden. Der unvollständige Verdau ist vermutlich neben der Substitution mit Ferulasäure auf den hohen Verzweigungsgrad zurückzuführen, sodass keine für den *endo*-Mechanismus des Enzyms hinreichend langen Abschnitte 1,5-verknüpfter Arabinoseeinheiten in der verbleibenden Arabinanfraktion vorliegen. Das Verhältnis aus 1,5- und 1,3,5-verknüpften Arabinoseeinheiten ist bei der Kontrollprobe und AA10 identisch (jeweils 1,3) und steigt erst bei der erhöhten Enzymaktivität (AA40) moderat (1,7). Da die Arabinoseanteile sukzessive abnehmen (Abbildung 32), kann darauf geschlossen werden, dass die Kettenlänge zwar abnimmt, sich der strukturelle Aufbau jedoch nicht grundlegend verändert.

Bei den mit α -L-Arabinofuranosidase verdauten SBP konnte für AF10 im Vergleich zur Kontrollprobe erwartungsgemäß ein starker Rückgang an terminaler (28,0 zu 8,7 mol%), 1,3,5- (17,3 zu 1,7 mol%), 1,2,5- (1,8 zu 0,7 mol%) und 1,2,3,5- (3,6 zu 0,7 mol%) verknüpften Arabinoseeinheiten beobachtet werden. Dementsprechend ist ein Großteil der Verzweigungen abgespalten worden, sodass die Arabinane vorwiegend als lineare Ketten vorliegen. Durch die Inkubation mit erhöhter Enzymaktivität (AF40) ist eine weitere Abnahme der verzweigten Arabinosen erkennbar. Während der Anteil terminaler Arabinose moderat abnimmt (8,7 zu 7,1 mol%), geht der Anteil 1,5-verknüpfter Arabinose deutlich zurück (29,7 mol% zu 9,8 mol%). Da auch der durch Monosaccharidanalyse bestimmte Arabinoseanteil von 19 mol% (AF10) auf 8 mol% (AF40) verringert wird, ist davon auszugehen, dass die Länge der Arabinanketten deutlich reduziert wird. Dementsprechend ist die Arabinanfraktion von AF40 größtenteils aus kurzen, kaum verzweigten Arabinanen zusammengesetzt.

In der Galactanfraktion zeigen die relativen Verhältnisse, dass der Verdau mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase im Vergleich zur Kontrollprobe keine Veränderungen hervorruft. Die Behandlung mit α -L-Arabinofuranosidase führt hingegen zu einer Abnahme des relativen Anteils an 1,3,6-Galactose von 15,7 % (Kontrolle) auf 7,8 % (AF10) bzw. 4,4 % (AF40), die durch die Abspaltung endständiger Arabinoseeinheiten innerhalb der AG-II-Fraktion zu erklären ist. Bei Betrachtung der relativen Anteile von 1,2- und 1,2,4-verknüpften Rhamnoseeinheiten (43 - 46 % bzw. 54 - 57 %) ist ersichtlich, dass die Enzymbehandlungen mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase und α -L-Arabinofuranosidase, unabhängig von der Konzentration, nicht in einer Modifikation des Substitutionsgrads des RG-I-Rückgrats resultieren.

Zur weiteren Charakterisierung der Arabinanstrukturen wurde zusätzlich ein Screeningverfahren nach Wefers und Bunzel eingesetzt, bei dem die Arabinane durch Behandlung mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase in charakteristische Oligosaccharide gespalten werden, die mittels HPAEC-PAD(/MS) identifiziert und semiquantitativ erfasst werden (Wefers und Bunzel 2016a). Mithilfe dieser Methode können zusätzliche Strukturinformationen gewonnen werden, insbesondere über das Substitutionsmuster der Arabinanfraktion. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 33 sowohl als relative molare Anteile (links) als auch als absolute Massekonzentrationen (rechts) dargestellt. Die Strukturen der freigesetzten Arabinanooligosaccharide sind im Anhang abgebildet (Abbildung 40 (Hauptprodukte) und Abbildung 41 (Nebenprodukte)).

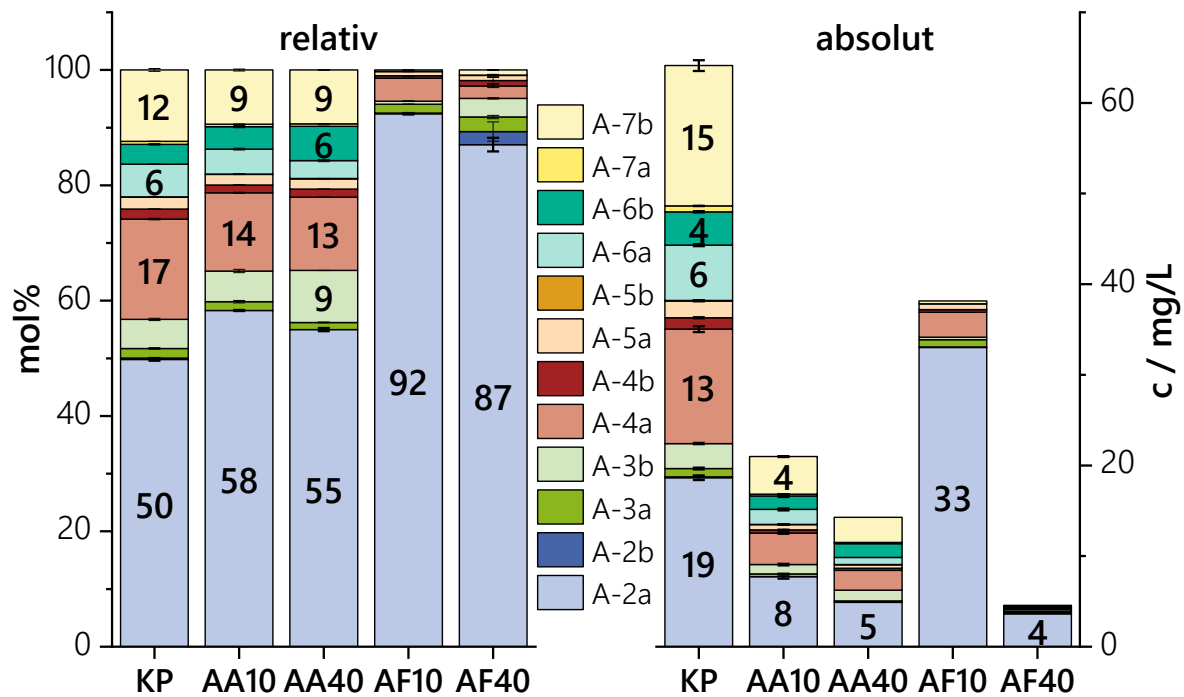


Abbildung 33: Relative Anteile (mol%, links) und absolute Gehalte (mg/L, rechts) an Arabinan oligosacchariden nach Inkubation mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase (AA; 200 U/g; 24 h; 40 °C) der enzymatisch mit AA bzw. α -L-Arabinofuranosidase (AF) modifizierten Pektine. Die eingesetzten Pektine wurden zuvor für 24 h bei 40 °C mit 10 U/g (AA10, AF10) bzw. 40 U/g (AA40, AF40) der jeweiligen Enzyme inkubiert. Die Kontrollprobe (KP) wurde unter gleichen Bedingungen ohne Enzymzugabe behandelt. Die Nomenklatur der charakteristischen Arabinan oligosaccharide erfolgt nach Wefers und Bunzel (2016a). Die Strukturen der Arabinan oligosaccharide sind im Anhang in Abbildung 40 (Hauptprodukte) bzw. Abbildung 41 (Nebenprodukte) dargestellt

In den untersuchten SBP konnten neben dem Dimer A-2a, das aus unverzweigten Abschnitten des Arabinanrückgrats freigesetzt wird, auch eine Vielzahl höhermolekularer und verzweigter Arabinan oligosaccharide festgestellt werden, was abermals die Komplexität der Arabinanstrukturen von SBP hervorhebt. Die Freisetzung dieser und ähnlicher Arabinan oligosaccharide aus Zuckerrüben wurde bereits in der Literatur beschrieben (Westphal *et al.* 2010b; Wefers und Bunzel 2016a).

Die relativen Anteile der aus der Kontrollprobe und den zuvor mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase behandelten SBP freigesetzten Arabinan oligosaccharide sind vergleichbar (Abbildung 33, links), während die absolut freigesetzte Menge an Oligosacchariden erwartungsgemäß bei AA10 und AA40 deutlich geringer ist (Abbildung 33, rechts). Neben A-2a sind das Tetramer A-4a sowie das Heptamer A-7b die quantitativ bedeutendsten Oligomere, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das Trimer A-3b bzw. das Hexamer A-6b ebenfalls in hohen Anteilen vorzufinden sind. Diese beiden Fragmente sind, ebenso wie A-4a bzw. A-7b, durch eine bzw. zwei Substitutionen des Arabinanrückgrats an Position O3 charakterisiert und könnten aufgrund einer α -L-Arabinofuranosidase Nebenaktivität des eingesetzten Enzympräparats aus A-4a (A-3b) bzw. A-7b (A-6b) gebildet werden. Es ist jedoch auch möglich, dass diese Arabinan oligosaccharide bereits im Zuge des Säureextraktionsverfahrens derart modifiziert wurden.

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

Zusätzlich zu diesen alternierend an Position O3 substituierten Arabinan oligosacchariden konnten auch Oligomere mit benachbarten O3-Substitutionen (A-6a) oder mit doppelt substituierten Rückgrateinheiten (O2 und O3, A-5a) nachgewiesen werden. Insbesondere bei Betrachtung der Massekonzentrationen ist somit ersichtlich, dass der überwiegende Teil der aus der Kontrollprobe, AA10 und AA40 freigesetzten Arabinose auf (hoch-) verzweigte Arabinan oligosaccharide zurückzuführen ist. Dabei scheinen die Verzweigungen so über das Arabinanrückgrat verteilt zu sein, dass es nur kurze unverzweigte Abschnitte gibt. Die Verzweigungen erfolgen meist über Position O3, wobei substituierte und unsubstituierte Arabinoseeinheiten oft alternierend aufeinanderfolgen. Einschränkend muss jedoch bedacht werden, dass die tatsächliche Arabinanstruktur hiervon abweichen könnte, da methodisch bedingt keine Aussagen über enzymatisch nicht-zugängliche Arabinane sowie über möglicherweise freigesetzte höhermolekulare Oligosaccharide (DP > 7) getroffen werden können. Da die Ergebnisse der Methylierungsanalyse jedoch auf vergleichbare Anteile der unterschiedlichen glykosidischen Bindungstypen hinweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die diskutierte Arabinanstruktur repräsentativ für die tatsächlich in SBP vorliegende Arabinanarchitektur ist.

Bei den zuvor mit α -L-Arabinofuranosidase inkubierten Pektinen wird die Verteilung der gebildeten Arabinan oligosaccharide erwartungsgemäß von A-2a dominiert (Abbildung 33). Daneben können lediglich geringe Mengen der verzweigten, niedermolekularen Oligomere A-3a, A-3b und A-4a beobachtet werden. Dementsprechend können die Ergebnisse der Methylierungsanalyse bestätigt werden, dass ein Großteil der Verzweigungen durch die vorhergehende Inkubation mit α -L-Arabinofuranosidase abgebaut wurde. Zudem kann bestätigt werden, dass die Arabinanstruktur von AF40 größtenteils aus linearen und kurzen Bruchstücken besteht, da durch den Verdau mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase nur noch geringe absolute Mengen an Oligosacchariden freigesetzt werden konnten (Abbildung 33, rechts).

Basierend auf der detaillierten Analyse der Arabinanstruktur können Schlussfolgerungen über die Zusammenhänge zwischen der Arabinanarchitektur und den Emulgiereigenschaften gezogen werden. Die Eigenschaften von AA10 und AA40 wurden schlechter, obwohl sich lediglich die Kettenlänge verändert hat und die Verzweigungen sowie der prinzipielle Arabinanaufbau weitestgehend konserviert wurden. Der Abbau von Verzweigungen durch α -L-Arabinofuranosidase führte ebenfalls zu einer merklichen Verschlechterung der Emulgiereigenschaften, obwohl die Kettenlänge des Arabinanrückgrats bei AF10 vermutlich nicht deutlich modifiziert wurde. Der Vergleich von AF10 und AA40 lässt jedoch vermuten, dass die Kettenlänge eine größere Bedeutung für die Emulgiereigenschaften hat als der Grad der Verzweigung; trotz geringerem Arabinosegehalt weist AF10 (lange, unverzweigte Ketten) bessere Eigenschaften auf als AA40 (kurze, verzweigte Ketten). Für einen Einfluss der Arabinankettenlänge sprechen auch die im Vergleich zu AF10 deutlich schlechteren Emulgiereigenschaften von AF40 (kurze, unverzweigte Ketten). Dementsprechend kann geschlossen werden, dass neben dem Arabinananteil auch der strukturelle Aufbau der Arabinanfraktion Einfluss auf die Emulgiereigenschaften von SBP hat. Die Emulsionstabilität scheint hingegen höchstens geringfügig durch den Arabinangehalt bzw. dessen Feinstruktur beeinflusst zu werden, da bei

keiner der Proben ein wesentlicher Anstieg der Tropfengröße nach 30 Tagen Lagerung festgestellt werden konnte (Tabelle 15).

4.3.3.4 ENZYMATISCHE MODIFIKATION DER GALACTURONANFRAKTION

Die Modifikation des Galacturonanrückgrats erfolgte mithilfe zweier Enzympräparate, die von der Erbslöh Geisenheim GmbH im Rahmen des AiF-Projekts 20218 N bereitgestellt wurden. Neben einer PGA, die zwischen nicht-methylveresterten Galacturonsäuremonomeren spaltet, wurde eine PLY eingesetzt, die über einen Eliminierungsmechanismus an methylveresterten Galacturonsäureeinheiten das Pektinrückgrat spalten kann. Über den kombinierten Ansatz wird gewährleistet, dass es über das gesamte Galacturonanrückgrat hinweg zu zufälligen Spaltungen kommen kann. Als Ausgangsmaterial für die enzymatische Modifikation des Galacturonanrückgrats wurde die gleiche Charge des Pektins ausgewählt, die auch für die Inkubation mit α -L-Arabinofuranosidase und *endo*- α -1,5-L-Arabinanase eingesetzt wurde. Ein partieller Abbau des Galacturonanrückgrats sollte durch unterschiedliche Inkubationszeiten (0, 20, 60, 180 min) bei pH 3,5 und 40 °C realisiert werden. Die Ergebnisse der Struktur- und Eigenschaftscharakterisierung der nach Hitzeinaktivierung und IPA-Präzipitation gewonnenen Pektine sind in Tabelle 17 dargestellt. Neben der Monosaccharidzusammensetzung (Abbildung 34), den Emulgiereigenschaften und dem M_w wurde auch der Methylierungs- und Acetylierungsgrad analysiert.

Tabelle 17: Präzipitatusbeuten (n = 1), Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und $x_{90,3}$ -Werte (n = 3) von Zuckerrübenpektinen nach enzymatischer Behandlung mit Polygalacturonase und Pektinlyase (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Der enzymatische Verdau erfolgte bei pH 3,5 und 40 °C für 20, 60 bzw. 180 min. Die Kontrollprobe (KP) wurde unter gleichen Bedingungen über 180 min ohne Enzymzugabe behandelt. DAc: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, M_w : Molekulargewicht (Gewichtsmittel), *t*-FA: *trans*-Ferulasäuregehalt, $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	Inkubationszeit / min			
	KP	20	60	180
Präzipitatusbeute / %	94	80	73	49
$x_{90,3}$ (Tag 0) / μm	0,80 \pm 0,01	0,79 \pm 0,03	1,06 \pm 0,02	3,28 \pm 0,11
$x_{90,3}$ (Tag 30) / μm	0,80 \pm 0,01	0,81 \pm 0,02	1,11 \pm 0,01	5,43 \pm 0,22
M_w / kDa	520 \pm 22	390 \pm 8	317 \pm 9	221 \pm 17
DM / %	64,8 \pm 0,7	58,1 \pm 1,2	48,6 \pm 0,1	44,0 \pm 0,3
DAc / %	42,9 \pm 0,1	43,9 \pm 0,7	41,2 \pm 0,5	45,7 \pm 0,1

Neben der Präzipitatusbeute nimmt auch das M_w der modifizierten Pektine mit zunehmender Inkubationsdauer von 520 kDa (t = 0 min) sukzessive auf 221 kDa (t = 180 min) ab. Die Monosaccharidzusammensetzungen der vier Pektine unterscheiden sich trotzdem nur in

4.3 Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Emulgiereigenschaften

geringem Umfang. Somit wurde das M_w erfolgreich gesenkt, ohne die Neutralzuckerfraktion signifikant zu modifizieren (Abbildung 34). Allerdings sind die im Vergleich zur Kontrollprobe leicht erhöhten Galacturonsäureanteile der enzymatisch behandelten SBP auffällig, da von einer leichten Verringerung durch die Abtrennung freigesetzter Galacturonsäureoligosaccharide auszugehen war. Dass dennoch höhere Galacturonsäureanteile festgestellt wurden, ist möglicherweise auf eine verbesserte Spaltung und Erfassung galacturonsäurehaltiger Strukturen im Rahmen der Methanolyse durch die vorhergehende enzymatische Modifikation zurückzuführen. Der Acetylierungsgrad wird durch die Enzyminkubation nicht verändert. Beim Grad der Methylveresterung ist hingegen eine mit zunehmender Inkubationszeit fortschreitende Abnahme zu beobachten (KP: 65 %; $t = 180 \text{ min}$: 44 %), was wahrscheinlich auf eine Methylesterase-Nebenaktivität des PGA-Präparats zurückzuführen ist (mündliche Mitteilung Fa. Erbslöh Geisenheim GmbH). Der Einfluss des Methylierungsgrads auf die Emulgiereigenschaften kann bei einer Verringerung in diesem Ausmaß als vernachlässigbar angesehen werden (s. Abschnitt 4.3.1.2 und 4.3.3.1).

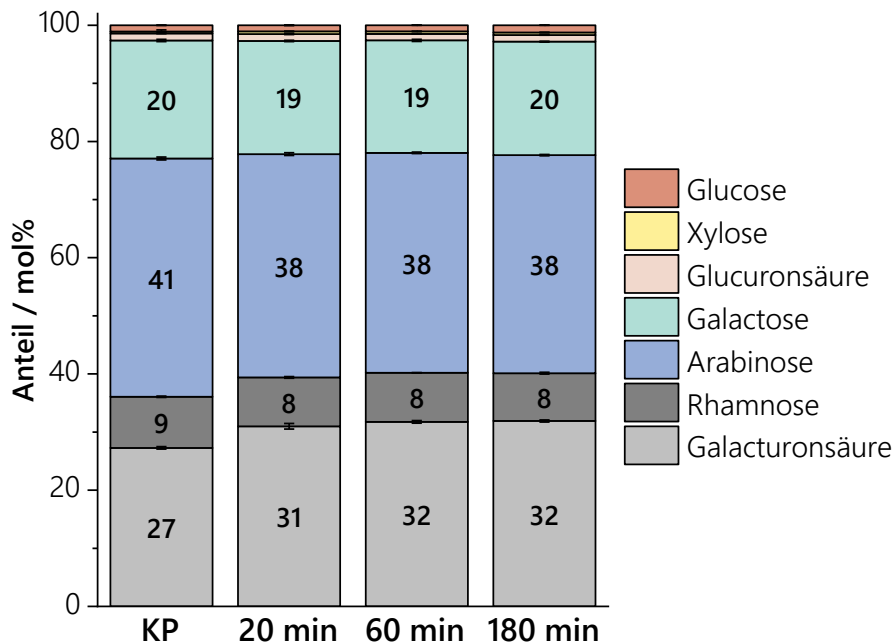


Abbildung 34: Monosaccharidzusammensetzungen von Zuckerrübenpektinen nach enzymatischer Modifikation mit Polygalacturonase und Pektinlyase (Fa. Erbslöh Geisenheim), bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse ($n = 3$). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion ($80 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH } 2$; 1 h) gewonnen. Der enzymatische Verdau erfolgte bei $\text{pH } 3,5$ und $40 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20, 60 bzw. 180 min. Die Kontrollprobe (KP) wurde unter gleichen Bedingungen über 180 min ohne Enzymzugabe behandelt

Die beim Vorversuch mit einem anderen PGA-Präparat festgestellte leichte Verbesserung der Emulgiereigenschaften (Abschnitt 4.3.3.2) konnte bei den mit PGA und PLY behandelten Proben nicht beobachtet werden. Die $x_{90,3}$ -Werte der Kontrollprobe und der Probe nach 20-minütiger Inkubation mit PGA und PLY zeigten zwar keine signifikante Verbesserung, aber auch keine Verschlechterung der Eigenschaften. Erklärt werden kann dies zum einen durch die im Vorversuch eingesetzten milderen Inkubationsbedingungen, die in einer geringeren Reduzierung des M_w

4 Ergebnisse und Diskussion

resultierten (760 auf 660 kDa). Zum anderen könnte auch das höhere absolute M_w des Ausgangs- bzw. Kontrollpektins beim Vorversuch eine Erklärung darstellen. Wie der in Abschnitt 4.3.1.8 diskutierten Auftragung des M_w gegen die Emulsionstropfengröße entnommen werden kann, weisen alle SBP mit $M_w > 650$ kDa sehr gute Emulgiereigenschaften auf ($x_{90,3}$ -Werte $< 1 \mu\text{m}$). In diesem hohen Molekulargewichtsbereich scheint demnach eine Spaltung des Galacturonanrückgrats zunächst zu einer leichten Verbesserung der Eigenschaften zu führen, womöglich aufgrund der verbesserten Adsorptionskinetik während des Emulgiervorgangs. Mit fortschreitender PGA- und/oder PLY-Aktivität kommt es dann allerdings zu einer Trendumkehr und stetig schlechteren Emulgiereigenschaften. Zu beobachten ist dieser Sachverhalt an den für 60 bzw. 180 min inkubierten SBP. Mit $x_{90,3}$ -Werten von 1,06 bzw. 3,28 μm ist eine drastische Erhöhung der stabilisierten Tropfengröße messbar. Darüber hinaus kann bei dem für 180 min inkubierten SBP als einzigem der modifizierten Pektine auch eine deutliche Abnahme der Emulsionsstabilität festgestellt werden, da die Emulsionstropfengröße nach 30 Tagen Lagerung stark anstieg ($x_{90,3}$: 5,43 μm). Dementsprechend wird bestätigt, dass ein gewisses Galacturonangerüst eine Grundvoraussetzung für gute Emulgiereigenschaften von SBP ist. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass mit fortschreitender Spaltung des Galacturonanrückgrats eine Trennung von HG- und RG-Fractionen wahrscheinlicher wird. Solange jedoch ein ausreichendes HG-RG-Netzwerk vorliegt, haben Änderungen des M_w offensichtlich keine deutlichen Auswirkungen auf die Emulgiereigenschaften von SBP.

Ein Vergleich der M_w der HG-modifizierten SBP und der Arabinan-modifizierten SBP (Tabelle 15) verdeutlicht den unterschiedlichen Effekt der Spaltung verschiedener Strukturmodule. Während beispielsweise das mit 40 U/g α -L-Arabinofuranosidase behandelte Pektin (AF40) bei einem M_w von 180 kDa einen $x_{90,3}$ von 1,20 μm aufweist, ist der $x_{90,3}$ des 180 min mit PGA und PLY behandelten Pektins mit 3,28 μm trotz des größeren M_w (220 kDa) bedeutend höher. Ein konträres Bild ergibt sich hingegen für die Proben AA40 und AF10: im Vergleich zum 20 min mit PGA und PLY behandelten Pektin wurden bei vergleichbaren M_w (380 - 390 kDa) größere mittlere Tropfengrößen stabilisiert.

Dementsprechend kann festgehalten werden, dass über das M_w , ebenso wie über den Arabinosegehalt, nur unter bestimmten Voraussetzungen Aussagen über die Emulgiereigenschaften von SBP getroffen werden können. Die Emulgiereigenschaften sind lediglich bei SBP, bei denen das Galacturonanrückgrat modifiziert wurde, von der Art und Anzahl der Verknüpfungen zwischen den unterschiedlichen Strukturblöcken und damit indirekt vom M_w abhängig. Jedoch gilt dies auch nur bei einer massiven Modifikation des Galacturonanrückgrats; vereinzelte Spaltungen im HG beeinflussen die Emulgiereigenschaften nicht, sofern das M_w der Pektineinheiten nur leicht reduziert wird. Gehäufte Spaltungen des Galacturonanrückgrats treten allerdings auch nur beim Einsatz spezieller Verfahren (z.B. Autoklavenbehandlung bei $\text{pH} > 4$) auf. Üblicherweise werden Pektine mittels Säureextraktionsverfahren gewonnen, die hauptsächlich Modifikationen der neutralen Seitenketten und kaum Veränderungen in der Galacturonanfraktion zur Folge haben. Bei säureextrahierten SBP spielt das M_w eine untergeordnete Rolle und die Emulgiereigenschaften sind maßgeblich vom Arabinananteil und dessen strukturellem Aufbau

abhängig (siehe Abschnitt 4.3.3.3). Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass SBP für hervorragende phasenvermittelnde Eigenschaften sowohl über ein möglichst intaktes Galacturonanrückgrat als auch über eine ausgeprägte Arabinanfraktion (hohe Kettenlänge, hoher Verzweigungsgrad) verfügen müssen.

4.4 UNTERSUCHUNG WEITERER PFLANZLICHER AUSGANGSMATERIALIEN

Nachdem das hohe Potential von SBP als Emulgator aufgezeigt wurde, sollte überprüft werden, inwiefern weitere regional anfallende Industrienebenprodukte als Rohstoffe zur Extraktion von Pektinen mit guten Emulgiereigenschaften geeignet sind. So wurden Kartoffelpülpel, Weintrauben- und Karottentrester als Ausgangsprodukte zur Pektinextraktion verwendet. Zum Vergleich mit bewährten Pektinrohstoffen wurden zudem Pektine aus Apfel- und Citrustrester extrahiert. Alle Pektine wurden unter gleichen Bedingungen aus den genannten Rohstoffen gewonnen. Dafür wurde eine milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewählt, da dieses Verfahren bei Zuckerrübenschnitzeln in einer hohen Ausbeute an Pektinen mit hervorragenden Emulgiereigenschaften resultierte. Die extrahierten Pektine wurden strukturcharakterisiert und hinsichtlich ihrer Emulgiereigenschaften untersucht. Die Ergebnisse der Analysen sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Pektinausbeuten (n = 2), Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und $x_{90,3}$ -Werte (n = 3) von aus unterschiedlichen Rohstoffen extrahierten Pektinen (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Alle Pektine wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. AT: Apfeltrester, CT: Citrustrester, DAC: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, KP: Kartoffelpülpel, KT: Karottentrester, M_w : Molekulargewicht (Gewichtsmittel), SB: Zuckerrübenschnitzel (*sugar beet pulp*), WT: Weintraubentrester (Rebsorte: Riesling), $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	SB*	KT	CT	WT	AT	KP
Ausbeute / %	15,6 \pm 0,4	21,7 \pm 3,1	18,7 \pm 1,2	4,7 \pm 0,1	10,2 \pm 0,1	8,3 \pm 0,1
$x_{90,3}$ / μ m	0,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	6,6 \pm 0,4	4,4 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1	3,7 \pm 0,1
Proteingehalt / %	6,0 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1	3,3 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1	6,9 \pm 0,3
M_w / kDa	913 \pm 19	277 \pm 9	151 \pm 7	416 \pm 6	437 \pm 23	430 \pm 14
DM / %	70,6 \pm 2,6	69,0 \pm 0,4	77,5 \pm 0,7	63,7 \pm 0,7	72,8 \pm 0,3	78,0 \pm 5,7
DAC / %	46,2 \pm 1,7	19,2 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	6,2 \pm 0,1	17,8 \pm 1,3

*alle Analysen n = 3

Erwartungsgemäß hat das Ausgangsmaterial einen entscheidenden Einfluss auf Ausbeute, Struktur und Eigenschaften des extrahierten Pektins. Für Karotten- und Citrustrester konnten höhere Ausbeuten, für Kartoffelpülpel, Apfel- und Weintraubentrester niedrigere Ausbeuten als bei Zuckerrübenschnitzeln erzielt werden. Die aus den Rohstoffen Citrus-, Apfel-, Weintraubentrester und Kartoffelpülpel gewonnenen Extrakte wiesen vergleichsweise schlechte

4 Ergebnisse und Diskussion

Emulgierereigenschaften auf, was sich in $x_{90,3}$ -Werten von 3,7 - 6,6 μm widerspiegelte. Die Emulsionen mit SBP und Karottenpektinen konnten hingegen deutlich kleinere Tropfen stabilisieren ($x_{90,3} = 0,8$ bzw. 1,2 μm). Strukturell unterscheiden sich die untersuchten Pektine ebenfalls deutlich voneinander. Lediglich die Methylierungsgrade liegen bei allen Pektinen in einem ähnlichen Bereich (64 bis 78 %). Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung können keine konkreten Rückschlüsse über die Zusammenhänge zwischen den Emulgierereigenschaften und der Molekülstruktur gezogen werden. Beispielsweise weisen die beiden Pektine mit den besten Emulgierereigenschaften (SBP und Karottentresterpektin), grundlegend unterschiedliche M_w (910 bzw. 280 kDa) und Acetylierungsgrade (46 bzw. 19 %) auf. Der Extrakt aus Kartoffelpülpe ist wiederum durch ein im Vergleich zum Karottenpektin höheres M_w (430 kDa) sowie einen vergleichbaren Acetylierungsgrad (18 %) bei deutlich schlechteren Emulgierereigenschaften ($x_{90,3}$: 3,7 μm) gekennzeichnet. Zudem weist das Citruspektin deutlich schlechtere Emulgierereigenschaften ($x_{90,3}$: 6,6 μm) auf als SBP ($x_{90,3}$: 0,8 μm), trotz ähnlich hohem Proteingehalt (jeweils 6,0 %).

Für eine nähere Strukturcharakterisierung wurden die Monosaccharidzusammensetzungen der Polysaccharidfraktionen ermittelt, die ebenfalls auf grundlegend unterschiedliche Polymerstrukturen schließen lassen (Abbildung 35). Die Anteile an Arabinose und Galactose deuten darauf hin, dass die neutralen Seitenketten der Apfel-, Citrus- und Weintraubenpektine, ebenso wie bei SBP, mehrheitlich aus Arabinanen zusammengesetzt sind. Bei den Karotten- und Kartoffelpektinen scheinen hingegen (Arabino-) Galactane die dominanten Strukturelemente der Seitenketten darzustellen. Die molaren Anteile an Monosacchariden, die auf Nicht-Pektinpolysaccharide wie Stärke oder Xyloglucane hindeuten, sind beim Citrus- und Karottenpektin ähnlich niedrig wie bei SBP, weshalb auf eine hohe Reinheit innerhalb der Polysaccharidfraktion geschlossen werden kann. Im Gegensatz hierzu macht Glucose bei den Extrakten aus Kartoffelpülpe, Apfel- und Weintraubentrester einen bedeutenden Anteil aus. Während die hohen Glucoseanteile beim Kartoffelextrakt aufgrund der Abwesenheit von Xylose auf eine unvollständige Entfernung von Stärke schließen lassen, könnte sich die Nicht-Pektinpolysaccharidfraktion bei Apfel- und Weintraubentrester neben Stärke auch aus Xyloglucanen und/oder Xylanen zusammensetzen. Zumindest ein Teil der Xylose ist jedoch vermutlich auf das Vorhandensein von Xylogalacturonelementen zurückzuführen (Bender *et al.* 2023).

Unter der Annahme, dass die Nicht-Pektinpolysaccharide keine Emulgieraktivität aufweisen, sind die effektiven Emulgatorkonzentrationen dieser Pektine geringer als beispielsweise bei SBP. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass aufgereinigte Pektinfraktionen in Emulsionen mit geringeren Tropfengrößen resultieren. Mit Ausnahme des Kartoffelextrakts, dessen Monosaccharidzusammensetzung durch Glucose dominiert wird, wären die Unterschiede in den Eigenschaften aller Voraussicht nach jedoch nur geringfügig. Darauf deuten unter anderem die Monosaccharidzusammensetzungen des Zuckerrüben- und Citrusextrakts hin, die bei grundsätzlich unterschiedlichen Emulgierereigenschaften ($x_{90,3}$: 0,8 μm (SBP) bzw. 6,6 μm (Citruspektin)) auf ähnlich niedrige Anteile an Nicht-Pektinpolysacchariden hinweisen. Reine

4.4 Untersuchung weiterer pflanzlicher Ausgangsmaterialien

Pektinfraktionen aus Kartoffelpülp, Apfel- und Weintraubentrester könnten durch zusätzliche enzymatische Aufreinigungsschritte erhalten werden. Die damit einhergehende Verringerung der bereits niedrigen Ausbeuten würde das Potential dieser Rohstoffe als Pektinquelle allerdings weiter schmälern. Alternativ könnten bei der Herstellung von Emulsionen auch höhere Extraktkonzentrationen eingesetzt werden, um die niedrigeren Anteile an Pektinfraktionen auszugleichen und bessere Emulgiereigenschaften zu erzielen. Allerdings können erhöhte Emulgatorkonzentrationen auch verschiedene negative Auswirkungen auf die Produktqualität haben. Ein Beispiel hierfür stellt die Viskositätserhöhung dar, die in einigen Lebensmittelanwendungen unerwünscht ist.

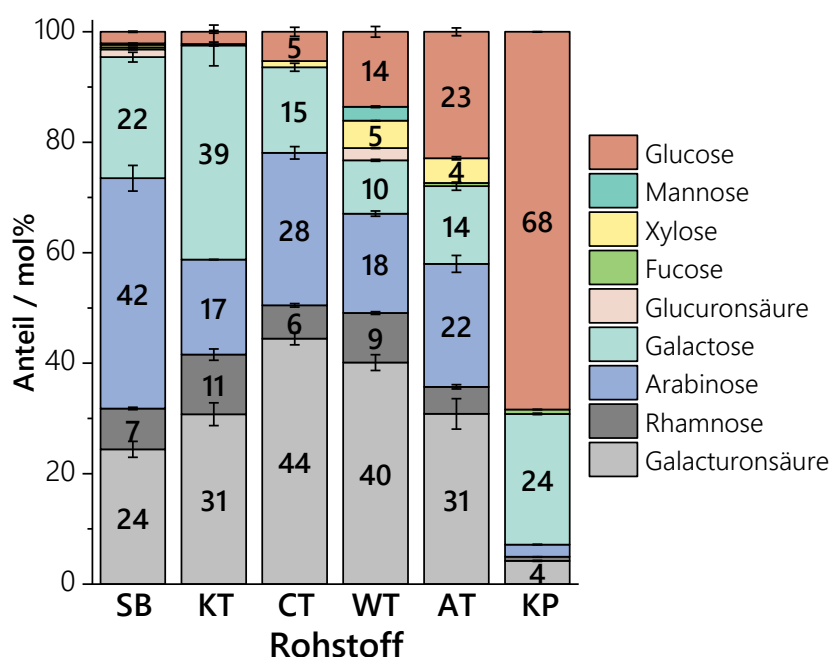


Abbildung 35: Monosaccharidzusammensetzungen von aus verschiedenen Rohstoffen extrahierten Pektinen, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3). Alle Pektine wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. AT: Apfeltrester, KT: Karottentrester, CT: Citrustrester, WT: Weintraubentrester (Rebsorte: Riesling), KP: Kartoffelpülp, SB: Zuckerrübenschnitzel (*sugar beet pulp*)

Bei der Einschätzung des kommerziellen Potentials der untersuchten Rohstoffe müssen neben den funktionellen Eigenschaften der Pektine, den Extraktionsausbeuten sowie der diskutierten Reinheit der Pektinfraktionen auch die regionalen Anbaumengen bedacht werden. In Deutschland wurden im Jahr 2021 etwa 32 Mt Zuckerrüben, 11 Mt Kartoffeln, 1,2 Mt Weintrauben und jeweils etwa 1 Mt Äpfel bzw. Karotten (inkl. Rüben) angebaut (FAO 2021). Dementsprechend wird das hohe Potential von SBP neben der hohen Pektinausbeute und den hervorragenden Emulgiereigenschaften auch durch die im Vergleich zu anderen Rohstoffen bedeutend höhere Menge an verfügbarem Ausgangsmaterial bekräftigt. Nichtsdestotrotz ermöglichen auch die Mengen der anderen Nebenprodukte der Industrie die Gewinnung großer Pektinmengen, sodass auch bei diesen Rohstoffen eine nähergehende Untersuchung der Emulgiereigenschaften der entsprechenden Pektine sinnvoll ist.

4 Ergebnisse und Diskussion

Von den untersuchten Rohstoffen weist lediglich das aus Karottentrester extrahierte Pektin annähernd gute Emulgierereigenschaften wie SBP auf. Die Pektinausbeute ist sogar höher als bei SBP, wobei beachtet werden muss, dass eine gesiebte Fraktion des Karottentresters mit niedrigerem Partikeldurchmesser (0,14 - 0,20 mm) als bei den anderen Ausgangsmaterialien verwendet wurde. Wie in Abschnitt 4.1 für SBP dargestellt wurde, ist bei Verwendung der gleichen Partikelgrößenfraktion wie bei den anderen Rohstoffen (bis 0,5 mm) eine geringere Ausbeute zu erwarten. Dementsprechend kann von einem hohen Potential von Karottentrester ausgegangen werden, welches jedoch durch nähergehende Untersuchungen mit nicht-fraktionierten Karottentrester überprüft und präzisiert werden müsste. Für die vorliegende Arbeit stand nicht-fraktionierter Karottentrester nicht zur Verfügung, weshalb mit Weintraubentrester ein anderer Rohstoff nähergehend untersucht wurde.

Weintraubentrester zählt zu den pflanzlichen Industrienebenprodukten, die regional in großen Mengen anfallen, aber nur in geringem Maße weiterverarbeitet oder anderweitig genutzt werden. Dementsprechend hoch wäre das Wertschöpfungspotential, falls Pektine mit guten Emulgierereigenschaften gewonnen werden könnten. Zwar konnte für Rieslingtrester weder eine hohe Ausbeute noch gute Emulgierereigenschaften des extrahierten Pektins festgestellt werden, jedoch legt die hohe Vielfalt an angebauten Rebsorten nahe, dass bei der Untersuchung weiterer Trester gegebenenfalls unterschiedliche Pektinstrukturen und damit auch abweichende Emulgierereigenschaften beobachtet werden könnten.

4.5 UNTERSUCHUNG VON WEINTRAUBENPEKTINEN

Riesling und Müller-Thurgau sind die Rebsorten mit der größten Anbaufläche in Deutschland, weshalb diese aus wirtschaftlicher Sicht am interessantesten sind. Dementsprechend wurde zunächst deren Eignung als Ausgangsmaterial zur Pektinextraktion nähergehend untersucht. In Vorversuchen wurde ermittelt, ob die Pektinausbeute und die Emulgierereigenschaften der entsprechenden Extrakte durch die im Trester enthaltenen Stielansätze und Kerne beeinflusst werden. Dazu wurden diese Tresterbestandteile, die die funktionellen Eigenschaften durch eine mögliche Koextraktion von Begleitsubstanzen wie Proanthocyanidinen oder Saponinen beeinflussen könnten, mittels eines Lochsiebes abgetrennt. Beim Vergleich der Ausbeute und der Emulgierereigenschaften konnten jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen dem fraktionierten und dem nicht-fraktionierten Trester festgestellt werden. Da die Abtrennung von Kernen und Stielansätzen einen zusätzlichen, schwierig skalierbaren Arbeitsschritt und darüber hinaus eine deutliche Verringerung des zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials bedeutet, wurden alle Weintraubenpektine aus den nicht-fraktionierten Trestern extrahiert.

Für Trester der Rebsorte Riesling konnte bei einer milden Säureextraktion (1 h; pH 2; 80 °C) eine im Vergleich zu SBP (15,6 %) deutlich geringere Ausbeute beobachtet werden (4,7 %; s. Tabelle 18). Die Ausbeute aus dem Trester der Rebsorte Müller-Thurgau lag bei dieser Extraktionsmethode mit 3,8 % unter der Pektinausbeute des Rieslingresters. Daher sollte

zunächst die Pektinausbeute der Extraktionen erhöht werden, um ausreichend Material für weiterführende Versuche extrahieren zu können und um das wirtschaftliche Potential des Weintresters genauer bestimmen zu können. Bei SBP konnte die Ausbeute durch Erhöhung der Extraktionszeit deutlich gesteigert werden, weshalb für Müller-Thurgau- und Rieslingtresters weitere Extraktionsansätze mit verlängerten Behandlungszeiten (16 h; pH 2; 80 °C) durchgeführt wurden. Für beide Rebsorten konnte hierbei eine Ausbeutesteigerung festgestellt werden. Allerdings waren die absoluten Ausbeuten mit 5,1 % (Müller-Thurgau) bzw. 5,6 % (Riesling) immer noch vergleichsweise gering. Neben der ähnlichen Ausbeute konnten auch keine grundlegenden Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung und den Emulgierereigenschaften zwischen den Rebsorten festgestellt werden (s. Anhang: Abbildung 42, Tabelle 34). Diese Beobachtung kann neben den vergleichbaren Anbaubedingungen auch auf die direkte botanische Abstammung zurückgeführt werden, da die Sorte Müller-Thurgau durch Kreuzung der Sorten Riesling und Madeleine Royale entstanden ist.

Die untersuchten Weintraubenpektine weisen eine im Vergleich zu SBP grundsätzlich unterschiedliche strukturelle Zusammensetzung auf. Wie bereits in Abschnitt 4.4 stellvertretend für Rieslingpektine diskutiert, liegen die Unterschiede zu SBP unter anderem in einem niedrigeren M_w , einem niedrigeren Proteingehalt und Acetylierungsgrad, einem erhöhten Anteil an Galacturonsäure und koextrahierten Nicht-Pektinpolysacchariden sowie der fehlenden Substitution der neutralen Seitenketten mit *trans*-Ferulasäure. Auch die stabilisierten Tropfengrößen sind, unabhängig von den Extraktionsbedingungen, im Vergleich zu SBP deutlich größer ($x_{90,3}$: 0,7 - 1,2 μm (SBP); 2,5 - 4,7 μm (Weintraubenpektine)). Auffällig war jedoch, dass die unter härteren Bedingungen extrahierten Weintraubenpektine deutlich bessere Emulgierereigenschaften aufwiesen ($x_{90,3}$: 2,5 μm (Müller-Thurgau) bzw. 2,7 μm (Riesling)), als die bei milden Bedingungen extrahierten Pektine ($x_{90,3}$: 4,7 μm (Müller-Thurgau) bzw. 4,4 μm (Riesling)). Dieser beobachtete Prozess-Eigenschaftszusammenhang ist offenbar konträr zu SBP, bei denen mildere Extraktionsbedingungen mit besseren Emulgierereigenschaften korrelierten.

Durch Säureextraktion gewonnene Pektine der Rebsorten Müller-Thurgau und Riesling weisen demnach sowohl geringere Ausbeuten als auch schlechtere Emulgierereigenschaften als SBP auf. Allerdings ist denkbar, dass andere Rebsorten oder Extraktionsverfahren in höheren Ausbeuten oder besseren Emulgierereigenschaften der Pektine resultieren. Um ein umfassenderes Bild über die Eignung von Weintraubenpektinen zu erhalten, wurden daher die Trester weiterer Rebsorten untersucht. Als Rebsorten wurden Muskateller und Silvaner ausgewählt, da diese in der Weinbaupraxis durch eine hohe Viskosität der Maische auffallen und somit erhöhte Pektingehalte aufweisen könnten (mündliche Mitteilung Fa. Erbslöh Geisenheim GmbH). Die Pektinextraktion aus diesen Rohstoffen wurde von Laura Schnepf im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Neben Säureextraktionen für 4 bzw. 16 h (pH 2; 80 °C) wurden auch 40-minütige Autoklavenextraktionen ohne Säurezugabe und enzymatisch-unterstützte Extraktionen durchgeführt. Im Gegensatz zur Pektinextraktion aus Zuckerrüben konnte die Ausbeute durch eine nachgeschaltete Enzyminkubation mit Cellulase allerdings nicht merklich erhöht werden (Schnepf 2020). Da auch lange Extraktionszeiten (4, 16 h) bei pH 2 und Autoklavenextraktionen

4 Ergebnisse und Diskussion

die Ausbeute nicht über 7 % steigern konnten, ist davon auszugehen, dass die Pektinausbeute generell nicht weiter gesteigert werden kann und dass daher keine mit Zuckerrübenschnitzeln vergleichbaren Ausbeuten erzielt werden können. Die Ausbeuten, relevante Strukturparameter und $x_{90,3}$ -Werte der verschiedenen Silvaner- und Muskatellerpektine sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Pektinausbeuten (n = 2 für Autoklavenextraktionen, n = 3 für Säureextraktionen) sowie Emulgiereigenschafts- (n = 3) und Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 (M_w)) der aus Silvaner- und Muskatellertrester extrahierten Pektine (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Die Säureextraktionen wurden bei 80 °C und pH 2 für 4 h bzw. 16 h durchgeführt, die Autoklavenextraktionen ohne Säurezugabe bei 121 °C für 40 min. DAC: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, M_w : Molekulargewicht (Gewichtsmittel), n.b.: nicht bestimmt, $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	Silvaner			Muskateller		
	4 h; pH 2	16 h; pH 2	Autoklav	4 h; pH 2	16 h; pH 2	Autoklav
Ausbeute / %	5,3 \pm 0,1	4,7 \pm 0,2	6,7 \pm 1,0	5,4 \pm 0,1	5,8 \pm 0,2	6,7 \pm 0,2
$x_{90,3}$ (Tag 0) / μ m	4,5 \pm 0,2	3,3 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1
$x_{90,3}$ (Tag 30) / μ m	10,8 \pm 1,0	5,2 \pm 0,4	n.b.	3,3 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1
M_w / kDa	117 \pm 17	49 \pm 5	76 \pm 12	150 \pm 12	63 \pm 10	68 \pm 7
Protein / %	4,0 \pm 0,2	4,3 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1	3,7 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1
DM / %	67,1 \pm 1,7	47,1 \pm 0,4	69,5 \pm 0,3	63,4 \pm 0,9	58,3 \pm 0,9	76,2 \pm 1,5
DAC / %	4,5 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	6,9 \pm 0,3	4,0 \pm 0,4	2,3 \pm 0,2	8,2 \pm 0,7

Wie auch bei den säureextrahierten Riesling- und Müller-Thurgau-Pektinen konnte mit zunehmender Extraktionszeit keine Verschlechterung der Emulgiereigenschaften bei den Extrakten aus Silvaner- und Muskatellertrester festgestellt werden. Das 16 h extrahierte Silvanerpektin konnte sogar erheblich kleinere Tropfen stabilisieren ($x_{90,3}$: 3,3 μ m) als das durch vierstündige Extraktion gewonnene Silvanerpektin ($x_{90,3}$: 6,0 μ m). Bei den Autoklavenextrakten konnten hingegen rebsortenabhängige Unterschiede in den Eigenschaften beobachtet werden. Während bei Silvaner eine ähnliche durchschnittliche Tropfengröße wie beim säureextrahierten Pektin (16 h) gemessen wurde, zeigte das autoklavenextrahierte Muskatellerpektin deutlich verbesserte Eigenschaften. Mit einem $x_{90,3}$ von 1,37 μ m näherte sich dieses Weintraubenpektin sogar dem Tropfengrößenbereich von SBP-stabilisierten Emulsionen an. Dementsprechend weisen Weintraubenpektine durchaus Potential als Emulgatoren auf. Allerdings sind die Beziehungen zwischen den Extraktionsbedingungen und den Emulgiereigenschaften offenbar komplex und weichen von den für SBP beobachteten Zusammenhängen ab, weshalb zur Aufklärung weiterführende Untersuchungen vonnöten wären.

Anhand der in Tabelle 19 dargestellten strukturellen Zusammensetzung der verschiedenen Weintraubenpektine können die Unterschiede in den Emulgiereigenschaften nicht erklärt werden. Die Proteingehalte aller 6 Extrakte sind in einem ähnlichen Bereich und auch bei den M_w und den Methylierungs- bzw. Acetylierungsgraden konnten keine auffälligen Unterschiede zwischen den

Rebsorten festgestellt werden. Um weitere Einblicke in die vorliegenden Polysaccharidstrukturen zu erhalten, wurde zusätzlich die Monosaccharidzusammensetzung der Muskateller- und Silvanerpektine bestimmt (Abbildung 36).

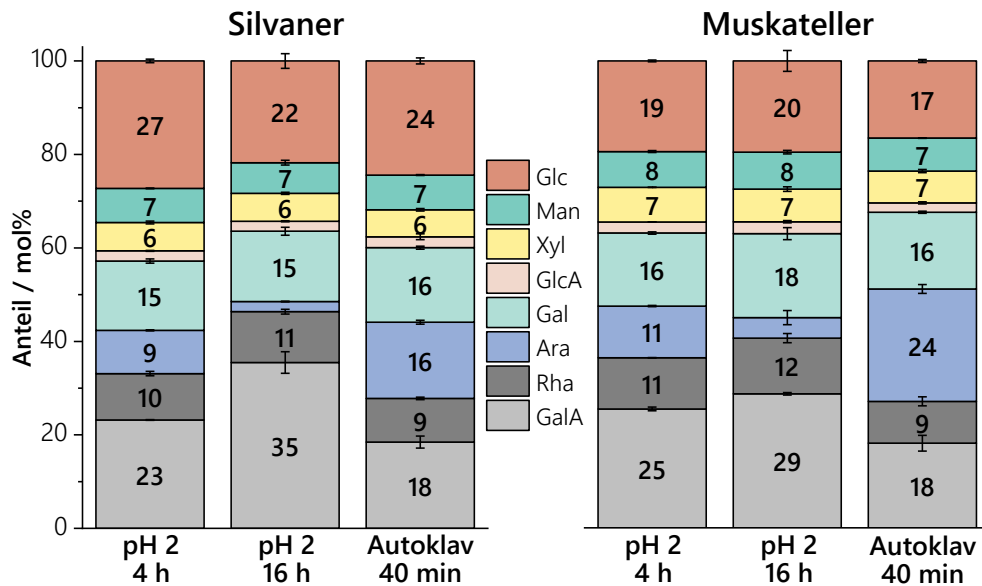


Abbildung 36: Monosaccharidzusammensetzungen der aus Silvaner- (links) und Muskatellertrester (rechts) extrahierten Pektine, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse ($n = 3$). Die Säureextraktionen wurden bei 80 °C und pH 2 für 4 bzw. 16 h durchgeführt, die Autoklavenextraktionen ohne Säurezugabe bei 121 °C für 40 min. Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, GlcA: Glucuronsäure, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

Die Verteilungen ähneln der bereits für Riesling gezeigten Monosaccharidzusammensetzung (Abbildung 35): neben den Pektinelementen zuzuordnenden Monosacchariden Galacturonsäure, Rhamnose, Galactose und Arabinose sind auch vergleichsweise hohe Anteile an Glucose, Mannose und Xylose enthalten. Während Xylose zumindest teilweise aus Xylogalacturonanstrukturen stammen könnte, deuten die Anteile von Glucose und Mannose auf die vermehrte Koextraktion von Stärke und Hemicellulosen hin. Der Galactoseanteil ist über alle Proben hinweg ähnlich hoch, während der Arabinoseanteil erwartungsgemäß bei den säureextrahierten Weintraubenpektinen niedriger als bei den autoklavenextrahierten Pektinen ist. Dementsprechend ist auch das Verhältnis aus neutralen Seitenketten (Arabinose + Galactose) und Galacturonanrückgrat (Galacturonsäure + Rhamnose) bei den autoklavenbehandelten Proben am höchsten. Den höchsten Anteil neutraler Seitenketten hat dabei das autoklavenextrahierte Muskatellerpektin. Generell können beim Vergleich der beiden Rebsorten für Muskatellerpektine höhere Arabinoseanteile sowie niedrigere Glucoseanteile beobachtet werden. Nichtsdestotrotz kann, anders als bei SBP, für die untersuchten Weintraubenextrakte kein Zusammenhang zwischen dem Anteil arabinosehaltiger Seitenketten und den Emulgierereigenschaften beobachtet werden. Zwar hat das autoklavenextrahierte Muskatellerpektin den höchsten Anteil arabinosehaltiger Seitenketten und die besten Emulgierereigenschaften, doch für die anderen Extrakte kann dieser positive Zusammenhang nicht bestätigt werden. Auch für die weiteren strukturellen Charakteristika wie M_w , Proteingehalt,

4 Ergebnisse und Diskussion

Methylierungs- und Acetylierungsgrad (Tabelle 19) kann keine eindeutige Korrelation mit den Emulgierereigenschaften beobachtet werden.

Ein möglicher Grund dafür, dass keine Struktur-Eigenschaftsbeziehungen ersichtlich sind, könnte der durchgehend hohe Anteil koextrahierter Nicht-Pektinpolysaccharide der Weintraubenextrakte sein. Durch unterschiedliche Anteile und Zusammensetzungen dieser Fraktionen können möglicherweise Wechselwirkungen mit den Pektinstrukturen ausgebildet werden, die die Emulgierereigenschaften des Extrakts beeinflussen. Zudem wird die effektive Emulgatorkonzentration herabgesetzt, was eine weitere Erklärung für die generell schlechteren Emulgierereigenschaften von Weintraubenpektinen im Vergleich zu SBP sein könnte. Glucose stellt für alle untersuchten Weintraubenextrakte das Monomer dar, welches den höchsten Anteil der nicht Pektinen zuzuordnenden Monosaccharide ausmacht (Abbildung 36). Um zu überprüfen, ob Glucose auf mitextrahierte Stärke zurückzuführen ist, wurde in einem größeren Maßstab eine weitere Charge des durch 40-minütige Autoklavenbehandlung erhaltenen Muskatellerpektins extrahiert. Ein Teil dieses Extrakts wurde gelöst und mit einem Amyloglucosidasepräparat inkubiert, sodass der Glucoseanteil reduziert werden sollte, falls die Glucose in Form von Stärke vorlag. In der Tat konnte der Glucoseanteil durch die Inkubation von etwa 18 auf 1 mol% reduziert werden (Abbildung 37). Allerdings wurde ein Teil der Glucose auch in der Kontrollprobe entfernt, die ohne Enzymzugabe unter ansonsten identischen Bedingungen behandelt wurde (11 mol%).

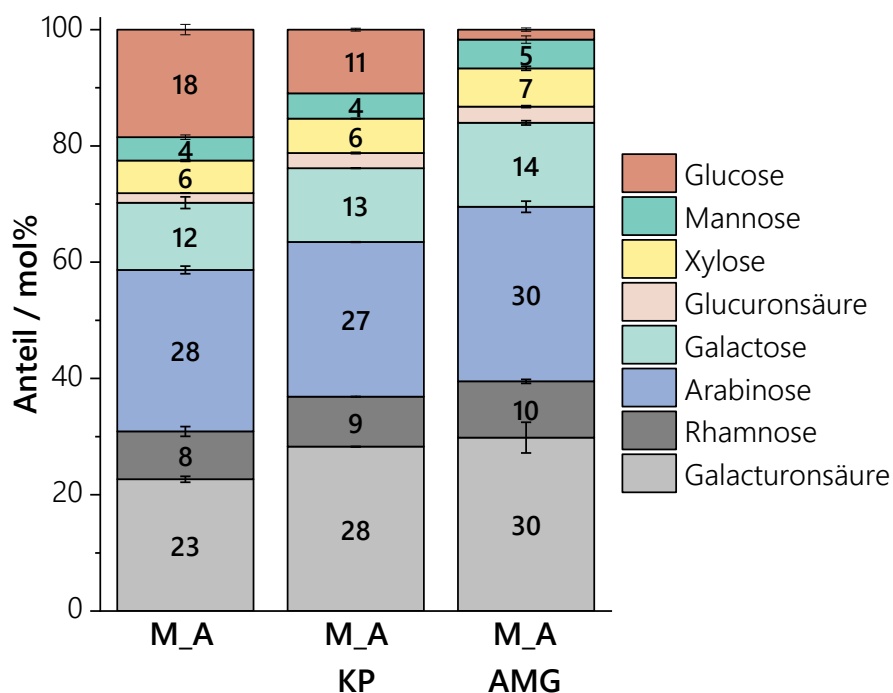


Abbildung 37: Monosaccharidzusammensetzungen eines mit Amyloglucosidase behandelten Pektins aus Muskatellertrester (M_A AMG), des Ausgangspektins (M_A) und einer Kontrollprobe (M_A KP), bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3). M_A wurde durch 40-minütige Autoklavenbehandlung (121 °C) extrahiert. Für M_A AMG wurde M_A gelöst und nach Zugabe von 75 U/g Amyloglucosidase für 16 h bei 40 °C inkubiert. M_A KP wurde unter den gleichen Bedingungen ohne Enzymzugabe aufgearbeitet

Vermutlich ist der geringere Glucoseanteil auf das erneute Lösen und Ausfällen zurückzuführen, wodurch sich neue Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Polymeren ausbilden können. Dies könnte zur Folge haben, dass zuvor möglicherweise eingeschlossene oder assoziiert vorliegende glucosehaltige Moleküle nicht mehr mitgefällt werden. Die Emulgiereigenschaften der drei Pektine unterscheiden sich nur geringfügig. Mit $1,28 \mu\text{m}$ ist der $x_{90,3}$ der Kontrollprobe zwar niedriger als der $x_{90,3}$ der Ursprungsprobe ($1,37 \mu\text{m}$). Das durch Amyloglucosidaseverdau fast glucosefreie Pektin weist mit $1,31 \mu\text{m}$ jedoch wieder einen etwas höheren $x_{90,3}$ -Wert auf. Dementsprechend scheint die Koextraktion von Stärke und anderen glucosehaltigen Polymeren keinen deutlichen Einfluss auf die Emulgiereigenschaften von Weintraubenpektinen zu haben. Daher müssen die unterschiedlichen Emulgiereigenschaften der aus Trestern verschiedener Rebsorten extrahierten Pektine auf Unterschiede in der chemischen Feinstruktur der jeweiligen Pektinfraktionen zurückzuführen sein. Zur Ermittlung eindeutiger Prozess-Struktur- und Struktur-Eigenschaftszusammenhänge für Weintraubenpektine müssten jedoch weitere Pektinextraktionen und Strukturcharakterisierungen sowie gezielte Strukturmodifikationen durchgeführt werden.

4.6 ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION

Die Extraktion einer Vielzahl strukturell unterschiedlicher SBP durch die Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden ermöglichte eine detaillierte Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Prozessbedingungen, der Molekülstruktur und den Emulgiereigenschaften. Dabei ließ die Verwendung von sowohl harschen als auch vergleichsweise milden Extraktionsbedingungen die Betrachtung einer im Vergleich zu anderen Studien größeren Vielfalt an Pektinen zu, da nicht nur stark modifizierte, sondern auch mäßig und gering modifizierte Pektine untersucht wurden. Zudem konnten die Struktur-Eigenschaftskorrelationen durch gezielte Modifikationen eines mild extrahierten SBP unter anderem mithilfe verschiedener, spezifischer Enzyme überprüft und näher bestimmt werden.

Aus der Auftragung des Proteingehalts von 43 säureextrahierten SBP gegen die mittleren Tropfengrößen der entsprechenden Modellemulsionen ging hervor, dass erhöhte Proteingehalte im Bereich von etwa 2 - 8 % keinen positiven Einfluss auf die Emulgiereigenschaften haben. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte durch eine partielle enzymatische Deproteinierung ebenfalls keine deutliche Vergrößerung der stabilisierten Tropfengröße festgestellt werden, sodass von einem untergeordneten Einfluss des Proteingehalts auf die Emulgiereigenschaften von SBP ausgegangen werden kann. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da bereits gezeigt werden konnte, dass bei pektinstabilisierten Emulsionen die an die Öl-Wasser-Grenzfläche adsorbierte Fraktion unter anderem durch stark erhöhte Proteingehalte gekennzeichnet ist (Akhtar *et al.* 2002; Leroux *et al.* 2003; Siew und Williams 2008). Dementsprechend wird in der Literatur häufig der erhöhte Proteingehalt als einer der Gründe aufgeführt, der den im Vergleich zu Pektinen aus anderen Rohstoffen besseren

4 Ergebnisse und Diskussion

Emulgierereigenschaften von SBP zugrunde liegt (Leroux *et al.* 2003; Williams *et al.* 2005; Funami *et al.* 2007; Funami *et al.* 2011; Schmidt *et al.* 2015b). Eine mögliche Erklärung für die zunächst widersprüchlich erscheinenden Erkenntnisse ist, dass alle in dieser Arbeit untersuchten SBP hinreichende Proteingehalte aufweisen, die eine effektive Abdeckung der Öl-Wasser-Grenzfläche gewährleisten. Eine weitergehende Modifizierung durch erhöhte Gehalte an Proteinen, welche eine höhere Hydrophobizität aufweisen als Pektine, wirkt sich dann nicht positiv auf die Emulgierereigenschaften aus. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Anteile anderer Strukturelemente entsprechend abnehmen und das Verhältnis von hydrophoben und hydrophilen Strukturen von den optimalen Bedingungen abweicht. Für diese Hypothese spricht auch, dass eine deutliche Beeinflussung der Emulgierereigenschaften durch Proteaseinkubationen in bereits veröffentlichten Studien dann beobachtet wurde, wenn die Proteinfraction nahezu vollständig (Proteingehalt < 1 %) entfernt wurde (Funami *et al.* 2007; Funami *et al.* 2011; Chen *et al.* 2016b). Im Bereich von 3 - 6 % Protein konnten Chen *et al.* (2016b) hingegen ebenfalls beobachten, dass der Proteingehalt von SBP keinen Einfluss auf die Emulgierereigenschaften hat. Dementsprechend kann geschlossen werden, dass lediglich vergleichsweise niedrige Proteingehalte von etwa 2 - 3 % für gute Emulgierereigenschaften von SBP vonnöten sind. Für die in dieser Arbeit untersuchten SBP mit durchweg höheren Proteingehalten konnte zudem kein Einfluss der Aminosäurezusammensetzung der Proteine auf die Emulgierereigenschaften festgestellt werden. Der vernachlässigbare Einfluss unterschiedlicher Anteile hydrophober und hydrophiler Aminosäuren bekräftigt, dass bei hinreichenden Proteingehalten zusätzliche Proteinanteile keine positiven Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften haben. Über den Einfluss der Aminosäurezusammensetzung bei SBP mit stark reduzierten Proteingehalten kann anhand der in dieser Arbeit analysierten Proben keine Aussage getroffen werden.

Neben dem erhöhten Proteingehalt werden die im Vergleich zu anderen Pektinen überlegenen Emulgierereigenschaften von SBP häufig auch auf das Vorliegen ferulasäurehaltiger Arabinan- oder (Arabino-) Galactanseitenketten zurückgeführt (Siew und Williams 2008; Chen *et al.* 2016a). Die Substitution der neutralen Seitenketten mit *trans*-Ferulasäure soll als hydrophobe Modifizierung zu einer erhöhten Oberflächenaktivität und damit, im Rahmen des Emulgierprozesses, zu einer verbesserten Anlagerung der Pektinkomplexe an die Öltröpfchen führen. So konnte für SBP bereits gezeigt werden, dass die an die Tropfenoberfläche adsorbierten Fraktionen nicht nur durch erhöhte Protein-, sondern auch durch erhöhte *trans*-Ferulasäuregehalte gekennzeichnet sind (Siew und Williams 2008). Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass SBP mit erhöhten *trans*-Ferulasäuregehalten verbesserte Emulgierereigenschaften aufweisen. Anhand der Auftragung der *trans*-Ferulasäuregehalte von 43 strukturell unterschiedlichen SBP gegen die Tropfengröße der entsprechenden Emulsionen konnte jedoch gezeigt werden, dass im Bereich von etwa 500 - 900 mg *trans*-Ferulasäure/100 g SBP kein direkter Zusammenhang zwischen dem *trans*-Ferulasäuregehalt und den Emulgierereigenschaften besteht. Sowohl Pektine mit niedrigen als auch mit hohen *trans*-Ferulasäuregehalten wiesen gute Emulgierereigenschaften auf, sodass bei säureextrahierten SBP von einem nachgeordneten Einfluss des *trans*-Ferulasäuregehalts auf die

Emulgierereigenschaften ausgegangen werden kann. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt wäre, dass alle untersuchten SBP analog zu den hinreichenden Proteingehalten auch hinreichende *trans*-Ferulasäuregehalte aufweisen, die eine effektive Abdeckung der Öl-Wasser-Grenzfläche ermöglichen. Nicht auszuschließen ist jedoch auch, dass die an die Öltröpfen adsorbierten Pektinfraktionen zwar einen erhöhten *trans*-Ferulasäuregehalt aufweisen, dieser aber nicht kausal mit den Emulgierereigenschaften zusammenhängt.

Für eine hinreichende Hydrophobizität aller untersuchten SBP spricht auch die Tatsache, dass kein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad und den Emulgierereigenschaften beobachtet werden konnte. Höhere oder niedrigere Methylierungsgrade wirkten sich im Bereich von etwa 47 - 76 % nicht maßgeblich auf die Emulgierereigenschaften von SBP aus. Neben einem generell niedrigen Einfluss des Methylierungsgrads könnten auch die hohen Protein- und *trans*-Ferulasäuregehalte und damit der generell hohe Anteil amphiphiler bzw. hydrophober Strukturen am Polymer für die geringe Beeinflussung der Emulgierereigenschaften durch den Methylierungsgrad verantwortlich sein. Auf einen geringfügigen Einfluss des Methylierungsgrads deuten auch die Ergebnisse des Versuchsansatzes hin, bei dem ein säureextrahiertes SBP durch milde Laugenbehandlung partiell verseift wurde. Trotz deutlicher Reduzierung des Methylierungsgrads von 74 % auf 14 % wies das modifizierte Pektin im Vergleich zum Kontrollpektin nur mäßig schlechtere Emulgierereigenschaften auf. Ferner lässt sich auch auf einen höchstens moderaten Einfluss des Acetylierungsgrads schließen, da dieser im Zuge der Laugenbehandlung von 49 % auf 23 % ebenfalls deutlich reduziert wurde. Diese Beobachtung deckt sich insofern mit den Erkenntnissen der Struktur-Eigenschaftskorrelationen, als dass bei den hierfür untersuchten SBP für hohe Acetylierungsgrade kein Zusammenhang mit den Eigenschaften zu erkennen war. Lediglich bei niedrigeren Acetylierungsgraden konnte ein Zusammenhang mit der stabilisierten Tropfengröße vermutet werden. Diese Erkenntnisse decken sich wiederum mit den Ergebnissen bisher veröffentlichter Studien zu SBP-stabilisierten, Ca^{2+} -armen Emulsionssystemen, bei denen gezeigt werden konnte, dass der Grad der Acetylierung einen stärkeren Einfluss auf die Emulgierereigenschaften hat als der Grad der Methylierung (Chen *et al.* 2016a; Ai *et al.* 2022).

Neben der Hydrophobizität des Polymers wird häufig auch das M_w als wichtiger Einflussfaktor für die Emulgierereigenschaften von SBP diskutiert. Dem zugrunde liegt die Vorstellung, dass größere Polymere einerseits eine bessere sterische Stabilisierung bieten und daher das Auftreten von Koaleszenz reduziert wird. Andererseits wird jedoch auch die Diffusionsgeschwindigkeit der Pektine bei der Anlagerung an die Öltröpfen verringert, sodass keine effektive Abdeckung der initial zur Verfügung stehenden Grenzfläche gewährleistet wird. Dementsprechend konnte beispielsweise durch thermisch-, Laccase/ O_2 -, Peroxidase/ H_2O_2 - oder Genipin-induzierte Quervernetzungsreaktionen von SBP eine Verbesserung der Emulsionsstabilität beobachtet werden, die insbesondere auf die Bildung größerer Polymere und damit die Zunahme des M_w zurückgeführt wird (Jung und Wicker 2012; Zhang *et al.* 2015; Lin *et al.* 2020b; Wang *et al.* 2021). Die Auswirkungen der durch diese Quervernetzungen bedingten Erhöhungen des M_w auf die initial erzeugten Tropfengrößen wiesen hingegen keinen einheitlichen Trend auf, da im Vergleich

4 Ergebnisse und Diskussion

zu den jeweiligen unmodifizierten Proben sowohl kleinere als auch größere mittlere Tropfengrößen ermittelt wurden.

Anhand der in dieser Arbeit untersuchten SBP kann der Einfluss des M_w auf die Emulsionsstabilität nicht näher charakterisiert werden, da alle untersuchten Emulsionen unter den gewählten Emulgier- und Lagerbedingungen stabil waren. Der in der Literatur beschriebene uneindeutige Zusammenhang zwischen dem M_w von SBP und der Emulsionstropfengröße kann insofern bestätigt werden, dass bei den in dieser Arbeit säureextrahierten SBP sowohl für hohe als auch für niedrigere M_w hervorragende Emulgiereigenschaften beobachtet werden konnten. Jedoch waren SBP mit niedrigem M_w teilweise auch durch schlechtere Emulgiereigenschaften charakterisiert. Aus der graphischen Auftragung der M_w gegen die mittleren Tropfengrößen ist allerdings auch ersichtlich, dass bei keinem der untersuchten SBP hohe M_w mit großen Tropfendurchmessern und daher schlechteren Emulgiereigenschaften einhergehen. Dementsprechend scheinen sich hohe M_w zwar tendenziell positiv auszuwirken, hinreichend für gute Emulgiereigenschaften können jedoch bereits niedrigere M_w sein. Vermutlich können die uneindeutigen Struktur-Eigenschaftszusammenhänge damit erklärt werden, dass das M_w die Emulgiereigenschaften zwar beeinflusst, die Auswirkungen anderer Strukturparameter bei hinreichend hohen M_w jedoch stärker ausgeprägt sind.

Zuvorderst ist hierbei das Verhältnis von neutralen Seitenketten zum Pektinrückgrat zu nennen. Die Auftragung dieses Verhältnisses gegen die Emulsionstropfengröße offenbarte für die in dieser Arbeit analysierten säureextrahierten SBP eine annähernd lineare Korrelation. Dabei gingen höhere Anteile an Arabinan- und (Arabino-) Galactanstrukturen mit besseren Emulgiereigenschaften einher. Diese vergleichsweise eindeutige Korrelation war insofern nicht zu erwarten, da die 43 untersuchten SBP unter stark variierenden Bedingungen extrahiert wurden (pH, Zeit, Komplexbildnerzugabe, Enzymeinsatz), die in mannigfaltigen und unterschiedlich stark ausgeprägten strukturellen Modifikationen der Pektine resultierten. Dementsprechend werden im Zuge der Pektinextraktion immer mehrere Strukturelemente parallel beeinflusst, sodass ein Rückschluss der Emulgiereigenschaftsänderung auf einen bestimmten Strukturparameter erschwert wird. Im Umkehrschluss deutet das Vorliegen einer Korrelation jedoch auf einen starken Einfluss dieser Strukturkomponente auf die Emulgiereigenschaften und damit potentiell auf einen kausalen Zusammenhang hin. Des Weiteren wird die Aussagekraft der beobachteten Korrelation durch die hohe Probenzahl sowie das breite Spektrum an unterschiedlichen Anteilen der verschiedenen Strukturelemente bestärkt. So wurden Proben untersucht, die von stark modifizierten, seitenkettenarmen SBP bis hin zu mild extrahierten SBP mit sehr hohen Arabinan- und (Arabino-) Galactananteilen reichten.

Zur näheren Spezifizierung der beobachteten Korrelation erfolgte eine separate Betrachtung des Einflusses der unterschiedlichen Pektinseitenketten. Dabei wurde deutlich, dass die beobachtete Korrelation zwischen dem Anteil neutraler Seitenketten und der Emulsionstropfengröße rein auf den Anteil arabinosehaltiger Seitenketten zurückzuführen ist. Der Anteil galactosehaltiger Pektinseitenketten korreliert hingegen nicht mit den

Emulgierereigenschaften. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Arabinanfraktionen einen entscheidenden Einfluss auf die Emulgierereigenschaften säureextrahierter SBP haben. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die im Vergleich zur AG-I-Fraktion tendenziell höhere Kettenlänge der Arabinane sein, die in einer besseren sterischen Stabilisierung des Pektinkomplexes im Zuge des Emulgierprozesses resultiert.

Jedoch belegt die Korrelation zwischen dem Anteil arabinosehaltiger Seitenketten und der Emulsionstropfengröße keinen ursächlichen Zusammenhang. Beispielsweise könnte die mit der partiellen Abspaltung der Arabinanfraktion einhergehende Verringerung des M_w oder des *trans*-Ferulasäuregehalts der beobachteten Korrelation zugrunde liegen. Jedoch konnten für diese beiden Strukturparameter, wie bereits diskutiert, keine Hinweise auf eine deutlich ausgeprägte Beeinflussung der Emulgierereigenschaften säureextrahierter SBP erhalten werden. Zumal in diesem Fall auch ein Einfluss der galactosehaltigen Seitenketten, die ebenfalls mit Ferulasäure verestert sein können, zu erwarten gewesen wäre. Daher wird die Hypothese eines kausalen Zusammenhangs zwischen dem Anteil arabinosehaltiger Seitenketten und den Emulgierereigenschaften bekräftigt.

Zur Bestätigung des Einflusses der jeweiligen Seitenkettenelemente wurden zunächst Inkubationsstudien mit *endo*- β -1,4-D-Galactanase und *endo*- α -1,5-L-Arabinanase durchgeführt. Die gezielte partielle Hydrolyse β -1,4-verknüpfter Galactane hatte dabei keine merkliche Auswirkung auf die stabilisierte Tropfengröße, womit die Ergebnisse der Struktur-Eigenschaftskorrelationen bestätigt werden konnten. Allerdings muss bedacht werden, dass mithilfe des eingesetzten Enzyms lediglich β -1,4-verknüpfte Galactane modifiziert wurden. Der Einfluss der AG-II-Fraktion konnte nicht näher bestimmt werden. Es ist möglich, dass der Anteil oder die Struktur der AG-II-Fraktion einen Einfluss auf die Emulgierereigenschaften haben könnten, da AG-II- bzw. AGP-Elemente durch die gebundenen Proteinkomponenten Verknüpfungspunkte zwischen unterschiedlichen Strukturblöcken der Pektine darstellen können. Dementsprechend könnten Modifikationen der AG-II- bzw. AGP-Elemente Separierungen unterschiedlicher Pektinstruktureinheiten bedingen und somit großen Einfluss auf die Emulgierereigenschaften haben. Im Gegensatz zum enzymatischen Galactanverdau bewirkte die durch *endo*- α -1,5-L-Arabinanase induzierte partielle Hydrolyse der Arabinanfraktion eine Verschlechterung der Emulgierereigenschaften des modifizierten SBP. Demnach konnte die aus den Struktur-Eigenschaftskorrelationen hervorgegangene Hypothese eines unterschiedlichen Einflusses der verschiedenen neutralen Pektinseitenketten auf die Emulgierereigenschaften bestätigt werden.

Zur Spezifizierung des Einflusses der Arabinanseitenketten wurden weitere enzymatische Hydrolysen durchgeführt, bei denen durch verschiedene Enzympräparate und Enzymaktivitäten ein mehrstufiger, unterschiedlich gearteter Abbau der Arabinanseitenketten dargestellt wurde. Zum einen wurden durch *endo*- α -1,5-L-Arabinanase erneut zufällige Spaltungen des α -1,5-verknüpften Arabinanrückgrats induziert. Durch den Einsatz höherer Enzymaktivitäten wurde dabei ein fortschreitender Arabinanabbau erzielt, sodass weitere Rückschlüsse über den Einfluss des Anteils an Arabinanen auf die Emulgierereigenschaften gezogen werden können. Zum anderen

4 Ergebnisse und Diskussion

wurde durch den Einsatz einer α -L-Arabinofuranosidase die Auswirkung einer Linearisierung bzw. eines weiterführenden Abbaus des Arabinanrückgrats untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht nur der Anteil an Arabinanen, sondern auch die strukturelle Komplexität der Arabinanseitenketten und insbesondere die Kettenlänge einen Einfluss auf die Emulgiereigenschaften säureextrahierter SBP haben. Die deutliche Beeinflussung der Emulgiereigenschaften durch die Kettenlänge kann damit erklärt werden, dass lange Arabinanketten eine effektive sterische Stabilisierung von an die Öl-Wasser-Grenzfläche adsorbierten Pektinen ermöglichen. Sterische Effekte sind vermutlich auch ein Grund dafür, dass sich ein höherer Verzweigungsgrad der Arabinanseitenketten, wenngleich weniger stark ausgeprägt, positiv auf die Emulgiereigenschaften von SBP auswirkt.

Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil sowie der Struktur arabinosehaltiger Seitenketten und den Emulgiereigenschaften konnte zwar für säureextrahierte SBP festgestellt werden, nicht jedoch für autoklavenextrahierte SBP. Pektine, die ohne Säurezugabe durch unterschiedlich lange Autoklavenbehandlung gewonnen wurden, sind durch vergleichbar hohe Anteile an arabinosehaltigen Seitenketten gekennzeichnet, die sich auch in ihrem strukturellen Aufbau ähneln. Dennoch sind deutliche Unterschiede bei den stabilisierten Tropfengrößen der durch unterschiedlich lange Autoklavenbehandlung bei pH 4,6 extrahierten SBP zu erkennen. Strukturell unterscheiden sich diese Pektine vornehmlich im M_w , welches im Vergleich zu säureextrahierten SBP zudem erheblich niedriger ist. Dementsprechend können die unterschiedlichen Emulgiereigenschaften der durch unterschiedlich lange Autoklavenbehandlung bei pH 4,6 extrahierten SBP vermutlich hauptsächlich auf die durch β -Eliminierungsreaktionen hervorgerufenen Spaltungen des Galacturonanrückgrats und die damit einhergehende Reduktion des M_w zurückgeführt werden. Die Abhängigkeit der Emulgiereigenschaften vom M_w konnte durch die gezielte Modifikation des Galacturonanrückgrats eines mild säureextrahierten SBP mittels PGA und PLY näher spezifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine leichte Reduktion des M_w bei weiterhin hohen absoluten M_w keine Auswirkungen auf die Emulgiereigenschaften von SBP hat. Erst bei fortschreitender Verringerung des M_w ist ein zunehmend stärker ausgeprägter Anstieg der stabilisierten Tropfengröße zu beobachten. Bei starker Modifikation des Galacturonanrückgrats konnte, trotz unterschiedlicher absoluter M_w , sowohl bei autoklavenextrahierten SBP als auch den enzymatisch modifizierten säureextrahierten SBP eine drastische Verschlechterung der Emulgiereigenschaften beobachtet werden.

Demnach wird bekräftigt, dass die chemische Feinstruktur und, wie bereits von Chen *et al.* (2016b) postuliert, die Verknüpfung der unterschiedlichen Polysaccharid- und Proteinkomponenten entscheidend für den Emulgiermechanismus von SBP ist, der auf dem amphiphilen Charakter des Polymers beruht. Unter der Annahme, dass die unterschiedlichen Pektinmotive durch ein Galacturonanrückgrat miteinander verknüpft sind, kann die Spaltung des Rückgrats zu einer Trennung hydrophiler und hydrophober Strukturen führen. Letztendlich resultiert dies in einem Verlust der Emulgierfähigkeit, da die einzelnen Strukturelemente ohne Verbindung zueinander keine phasenvermittelnden Eigenschaften ausüben können. Dementsprechend ist ein weitgehend intaktes Galacturonangrundgerüst neben einem

Mindestproteingehalt Voraussetzung für gute Emulgiereigenschaften von SBP. Solange diese Anforderungen erfüllt sind, haben der Proteingehalt und das M_w einen untergeordneten Einfluss auf die Emulgiereigenschaften, die dann maßgeblich durch den Anteil und die Architektur der arabinosehaltigen Seitenketten bestimmt werden. Unabhängig von der exakten Extraktionsmethode weisen alle SBP hinreichend hohe Proteingehalte und M_w auf, die unter gängigen Bedingungen bei niedrigen pH-Werten (< 4) extrahiert wurden. Da Extraktionen unter stark sauren Bedingungen nicht nur industriell die vorherrschenden Extraktionsmethoden darstellen, ist die Relevanz des aufgezeigten Zusammenhangs zwischen dem Anteil und dem strukturellen Aufbau der Arabinanfraktion und den Emulgiereigenschaften entsprechend hoch.

Die deutliche Beeinflussung der Emulgiereigenschaften säureextrahierter SBP durch den Anteil und die Struktur der Arabinanseitenketten oder auch allgemein durch die neutralen Seitenketten wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Funami *et al.* (2011) sowie Chen *et al.* (2016a) beobachteten zwar einen Anstieg der Emulsionstropfengröße eines durch eine kombinierte Inkubation mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase und *endo*- β -1,4-D-Galactanase modifizierten SBP, dieser fiel jedoch unter anderem im Vergleich zu einer enzymatischen Proteinreduktion geringer aus. Dementsprechend lag der Fokus bisher veröffentlichter Studien nicht auf dem Einfluss der Arabinan- und (Arabino-) Galactanfraktionen, was erklärt, weshalb der separate Einfluss der arabinosehaltigen bzw. galactosehaltigen Seitenketten noch nicht näher beschrieben wurde. Chen *et al.* (2016a) behandelten SBP auch separat mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase bzw. *endo*- β -1,4-D-Galactanase, konnten jedoch weder einen deutlichen noch einen unterschiedlich ausgeprägten Einfluss auf die Emulgiereigenschaften feststellen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass das für den *endo*- α -1,5-L-Arabinanase- bzw. *endo*- β -1,4-D-Galactanaseverdau eingesetzte SBP zuvor bereits mittels Protease- und Ferulasäureesterase stark modifiziert wurde, sodass keine Aussagen über den Einfluss der neutralen Seitenketten bei einem lediglich durch die Extraktion modifizierten SBP getroffen werden konnten. Neben dieser Einschränkung gibt es noch weitere Aspekte des Studiendesigns, die die zunächst widersprüchlich erscheinenden Erkenntnisse dieser Arbeit zu den bereits veröffentlichten Studien erklären können. Bei Studien, die den Einfluss einer enzymatischen Modifikation untersuchen, sind die Inkubationsbedingungen und damit das Ausmaß des enzymatischen Verdaus ein wichtiger Faktor. Beispielsweise erfolgte in dieser Arbeit lediglich ein partieller Abbau der Proteinfraction, während in der Literatur meist ein nahezu vollständiger Proteinabbau durchgeführt wurde. Dementsprechend lassen sich die unterschiedlichen Erkenntnisse zum Einfluss des Proteingehalts so in Einklang bringen, dass, wie bereits diskutiert, lediglich ein Proteinanteil von etwa 2 - 3 % für gute Emulgiereigenschaften notwendig ist.

Ein entscheidender Aspekt zur Einordnung der unterschiedlichen Studienergebnisse ist jedoch auch die Auswahl der untersuchten Pektinproben. Wie unter anderem bei den Studien von Funami *et al.* (2011) und Chen *et al.* (2016a) werden die Untersuchungen bezüglich der Emulgiereigenschaften gängigerweise entweder an kommerziellen oder an labortechnischen, aber unter ebenfalls stark sauren Bedingungen extrahierten SBP durchgeführt. Aufgrund der harschen Extraktionsbedingungen handelt es sich bei diesen Pektinen bereits um stark

4 Ergebnisse und Diskussion

modifizierte SBP, die unter anderem durch deutlich erniedrigte Anteile neutraler Seitenketten gekennzeichnet sind. Dementsprechend waren die bisherigen Schlussfolgerungen zum Einfluss der Molekülstruktur auf die Emulgiereigenschaften stets auf harsch extrahierte SBP beschränkt. Stellvertretend kann dies am Beispiel des Arabinose- bzw. Arabinananteils gezeigt werden, auch wenn andere Strukturcharakteristika wie das M_w oder der Acetylierungsgrad ebenfalls betroffen sind. So waren die von Funami *et al.* (2011) und Chen *et al.* (2016a) untersuchten Ausgangspektine lediglich durch Arabinosegehalte von etwa 7 bzw. 9 % gekennzeichnet, die entsprechend über einen enzymatischen Verdau nur geringfügig gesenkt werden konnten. Demnach ist die Aussagekraft über den Einfluss des Arabinananteils bei diesen Studien auf einen sehr kleinen Bereich beschränkt, der keine Schlussfolgerungen über den Einfluss der bereits abgespaltenen, hochverzweigten Arabinanstrukturen zulässt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterliegen dieser Einschränkung nicht, da erstmalig eine umfassende Untersuchung der Struktur-Eigenschaftsbeziehungen von SBP erfolgte, bei der das Spektrum von geringfügigen bis hin zu stark ausgeprägten Strukturmodifikationen abgedeckt wurde. Zudem wurde für die gezielte, mehrstufige Modifikation mittels unterschiedlicher Enzympräparate ein mild extrahiertes SBP ausgewählt. Dieses ist durch die vergleichsweise geringfügige Modifikation im Zuge der Extraktion durch hohe Anteile an neutralen Seitenketten, ein hohes M_w , einen hohen Acetylierungs- und Methylierungsgrad sowie einen hohen *trans*-Ferulasäuregehalt gekennzeichnet. Somit ergibt sich ein umfassenderes Bild der kausalen Zusammenhänge zwischen der molekularen Struktur und den Emulgiereigenschaften von SBP.

Zur Einordnung der diskutierten Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass alle Emulsionen in dieser Arbeit unter identischen Bedingungen produziert wurden und daher keine Aussagen über die Emulgiereigenschaften von Pektinen bei abweichenden Emulgierbedingungen getroffen werden können. Beispielsweise wäre ein stärkerer Einfluss des Methylierungsgrads bei Emulsionsformulierungen zu erwarten, die erhöhte Konzentrationen divalenter Kationen wie Ca^{2+} beinhalten. Höhere Methylierungsgrade verringern hierbei die Wahrscheinlichkeit, dass ionenvermittelte Fällungsreaktionen auftreten, die sich negativ auf die Emulsionsstabilität auswirken (Leroux *et al.* 2003). Des Weiteren sind abweichende Struktur-Eigenschaftszusammenhänge für Emulsionen zu erwarten, die bei niedrigeren pH-Werten als pH 5 hergestellt werden. Je niedriger der eingestellte pH-Wert, desto kleiner ist der Anteil dissoziiert vorliegender Säuregruppen bzw. desto höher ist der Anteil protoniert vorliegender basischer Gruppen. Dies hat Ladungsveränderungen sowohl im Galacturonanrückgrat als auch in der Proteinfraction zur Folge, sodass von deutlichen Veränderungen der inter- und intramolekularen Wechselwirkungen auszugehen ist. Dementsprechend sind auch Änderungen bei der Adsorptionsaffinität und -kinetik an die Öl-Wasser-Grenzfläche zu erwarten, die abweichende Struktur-Eigenschaftszusammenhänge zur Folge haben könnten.

Unter Berücksichtigung dieser Prämisse können die erarbeiteten Struktur-Eigenschaftszusammenhänge unter anderem auch herangezogen werden, um die Emulgiereigenschaften der im Zuge der Pektinextraktion bei verschiedenen IPA-zu-Extrakt-Verhältnissen ausgefällten SBP-Fractionen zu erklären. Die besseren Emulgiereigenschaften der

bei IPA-Konzentrationen von 40 - 70 % ausfällbaren Fraktion können darauf zurückgeführt werden, dass diese Fraktion im Vergleich zu den bei geringeren IPA-Konzentrationen präzipitierten Fraktionen durch einen niedrigeren, aber ausreichend hohen Proteingehalt, einen höheren Verzweigungsgrad der Arabinanfraktion, einen höheren Acetylierungsgrad und *trans*-Ferulasäuregehalt, ein höheres M_w sowie einen hohen Anteil an AG-II gekennzeichnet ist. Auffällig ist lediglich, dass die bei IPA-Konzentrationen von 20 - 40 % ausgefällte Fraktion einen höheren Arabinoseanteil aufweist und demnach bessere Emulgierereigenschaften zu erwarten gewesen wären. Doch unter Berücksichtigung des stark verringerten M_w kann erklärt werden, weshalb die 20 - 40 % Fraktion trotz höherem Arabinoseanteil schlechtere Emulgierereigenschaften aufweist. Allerdings ist zu beachten, dass auch der höhere Anteil an koextrahierten Nicht-Pektinpolysacchariden zu den schlechteren Emulgierereigenschaften dieser Fraktion beitragen könnte.

Bei aus Weintraubentrester extrahierten Pektinen konnte gezeigt werden, dass die koextrahierte Stärke nicht ursächlich für die im Vergleich zu SBP mäßigen Emulgierereigenschaften ist. Dementsprechend müssen die Unterschiede in den Emulgierereigenschaften auf die Strukturen der Pektinfraktionen zurückzuführen sein. Die größten Strukturunterschiede zu SBP sind dabei die fehlende Ferulasäuresubstitution der Seitenketten, der bedeutend niedrigere Acetylierungsgrad sowie das geringere M_w . Es liegt nahe, dass die unterschiedlichen Anteile dieser drei Parameter den ungleichen Emulgierereigenschaften von SBP und Weintraubenpektin zugrunde liegen. Auf die fundamentalen strukturellen Unterschiede ist höchstwahrscheinlich auch zurückzuführen, dass die für SBP beobachteten Prozess-Struktur-Eigenschaftszusammenhänge nicht direkt auf Weintraubenpektine übertragen werden konnten. Auch zwischen Weintraubenpektinen verschiedener Rebsorten konnten, trotz eines vergleichbaren strukturellen Aufbaus, keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen der Molekülstruktur und den Emulgierereigenschaften beobachtet werden.

Dementsprechend schwierig gestaltet sich auch die Erklärung der Beobachtung, dass das aus Karottentrester extrahierte Pektin deutlich bessere Emulgierereigenschaften aufweist als die Pektine aus Citrus-, Apfel- oder Weintraubentrester. Die genannten Pektine sind allesamt durch hinreichende Proteingehalte, M_w und Methylierungsgrade charakterisiert. Auch der Arabinoseanteil ist bei allen Pektinen moderat hoch, wobei das Karottenpektin sogar den niedrigsten Anteil an Arabinose aufweist. Die deutlich besseren Emulgierereigenschaften könnten somit auf Unterschiede in der Feinstruktur der Arabinanfraktion oder, wahrscheinlicher, auf den in Relation deutlich höheren Acetylierungsgrad des Karottenpektins zurückzuführen sein. Für SBP konnte gezeigt werden, dass im Bereich eher niedriger Acetylierungsgrade eine Korrelation mit den Emulgierereigenschaften besteht. Daher ist es denkbar, dass bei noch niedrigeren Acetylierungsgraden, wie sie bei Citrus-, Apfel- und Weintraubenpektinen vorzufinden sind, ein starker Einfluss auf die Emulgierereigenschaften besteht. Dafür spricht zudem, dass diese Pektine im Vergleich zu SBP durch die fehlende Ferulasäuresubstitution der Seitenketten ohnehin durch einen niedrigeren Grad an hydrophoben Modifizierungen gekennzeichnet sind. Für definitive Aussagen zu den Struktur-Eigenschaftszusammenhängen von Karotten-, Citrus-, Apfel- oder

4 Ergebnisse und Diskussion

Weintraubenpektinen wären allerdings weitergehende Untersuchungen notwendig. Zweifellos kann jedoch festgehalten werden, dass die Übertragung von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen zwischen Pektinen aus unterschiedlichen Rohstoffquellen aufgrund der großen strukturellen Vielfalt der Pektine nur bedingt möglich ist.

Nichtsdestotrotz können die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse nicht nur einen tieferen Einblick in die funktionellen Zusammenhänge zwischen der Pektinstruktur und den Emulgierereigenschaften von SBP geben. Es wurde auch offenkundig, dass das Potential von SBP als Emulgator bisher noch nicht ausgeschöpft wurde. So konnte gezeigt werden, dass durch im Vergleich zur industriellen Extraktionsmethodik mildere Bedingungen SBP mit deutlich verbesserten Emulgierereigenschaften gewonnen werden können. Der ökonomische Aspekt der damit verbundenen geringeren Pektinausbeute könnte durch die aufgezeigte optimierte Probenaufarbeitung sowie durch den Einsatz alternativer Extraktionsverfahren, wie enzymunterstützte Methoden oder Autoklavenbehandlungen, ausgeglichen werden. Ein weiterer Vorteil dieser SBP ist, dass bereits mit vergleichsweise niedrigen Konzentrationen Emulsionen mit sehr geringen Tropfengrößen erzeugt werden können. In weiterführenden Arbeiten am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik konnte zudem gezeigt werden, dass die mit diesen SBP hergestellten Emulsionen weder sensorisch noch optisch beeinträchtigt sind (FEI 2021; Bindereif *et al.* 2023). Dementsprechend stellen SBP, insbesondere unter Berücksichtigung des bislang nicht ausgeschöpften Potentials, eine vielversprechende Alternative zu herkömmlich eingesetzten Emulgatoren dar.

Das größte Hemmnis für die kommerzielle Anwendung optimierter Extraktionsmethoden ist allerdings, dass in der europäischen Union für den Lebensmittelzusatzstoff Pektin rechtlich ein Mindestgehalt an Galacturonsäure von 65 % vorgeschrieben ist (VO (EG) 1333/2008 und VO (EU) 231/2012). Dieser steht im Widerspruch zur in pflanzlichen Zellwänden vorliegenden und, insbesondere bei SBP, komplexen und seitenkettenreichen Pektinstruktur. Bei der Anwendung milder Extraktionsverfahren wird der Mindestgehalt an Galacturonsäure nicht erreicht, da es im Unterschied zur traditionell eingesetzten, stark sauren Extraktion nur zu einem verminderten Abbau der neutralen Seitenketten und insbesondere der Arabinanfraktion kommt. Da erhöhte Anteile an Arabinanen bei säureextrahierten SBP jedoch mit verbesserten Emulgierereigenschaften einhergehen, kann das Potential von SBP unter den gegebenen rechtlichen Voraussetzungen nicht in Gänze ausgeschöpft werden. Theoretisch könnte zwar die Galacturonanfraktion durch eine enzymatische Hydrolyse anderer Pektinstruktureinheiten angereichert werden, allerdings bieten sich dafür lediglich die Protein- und Galactanfraktion an, da hier bei einer partiellen Abtrennung keine Auswirkungen auf die Emulgierereigenschaften zu erwarten sind. Zudem könnte der Galacturonsäuregehalt nur geringfügig erhöht werden, da SBP mit guten Emulgierereigenschaften stets durch dominante Arabinanfraktionen gekennzeichnet sind und die Galactanfraktion dementsprechend nur einen geringen Teil des Pektins ausmacht. Die Reduktion des Proteinanteils könnte ebenso nur zu einer mäßigen Erhöhung des Galacturonsäuregehalts führen, zumal der Erhalt eines für gute Emulgierereigenschaften nötigen Mindestproteingehalts gewährleistet sein muss. Überdies würde die gezielte Hydrolyse den Einsatz spezifischer Enzyme

voraussetzen, was insbesondere bei industriellen Maßstäben aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten nicht zielführend wäre. Doch auch ohne die Anwendung der optimierten Extraktionsmethoden können die Erkenntnisse zur Bedeutung der Arabinanfraktion für die Emulgierereigenschaften säureextrahierter SBP auch industriell von Nutzen sein. Bei säureextrahierten SBP könnten die Emulgierereigenschaften eines Extrakts über die Analyse des Arabinosegehalts abgeschätzt werden, sodass aufwändige Untersuchungen zur Emulgieraktivität beispielsweise bei der Prozessentwicklung oder auch der Prozesskontrolle eingespart werden könnten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz von Emulgatoren und Stabilisatoren ist essentiell für die Herstellung langzeitstabiler, emulsionsbasierter Lebensmittel. Bedingt durch eine steigende Nachfrage nach pflanzlichen, regionalen und nachhaltigen Produkten werden Alternativen zu bewährten Emulgatoren wie Molkenproteinen oder Gummi arabicum gesucht. Aus Nebenströmen der Lebensmittelproduktion extrahierte Pektine können den genannten Erwartungen entsprechen, jedoch liegen bisher nicht genügend Informationen über den Zusammenhang zwischen den Extraktionsbedingungen, der Struktur der Pektine und deren Emulgiereigenschaften vor.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von Zuckerrübenpektinen (*sugar beet pectins*, SBP), da für SBP bereits gute Emulgiereigenschaften beschrieben wurden und Zuckerrüben zu den bedeutendsten landwirtschaftlichen Nutzpflanzen in Deutschland zählen. Die Extraktion und Analyse strukturell unterschiedlicher SBP sowie deren gezielte Modifikation sollte die Erfassung funktioneller Zusammenhänge zwischen dem Extraktionsprozess, der Molekülstruktur und den Emulgiereigenschaften ermöglichen. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge stellt unter anderem die Grundlage zur gezielten Optimierung von Extraktionsprozessen und damit zur potentiellen Nutzung von SBP als Emulgatoren dar. Abschließend sollte das Potential weiterer, bisher kaum zur Pektinextraktion genutzter pflanzlicher Rohstoffe untersucht werden und anhand von Weintraubenpektinen überprüft werden, inwieweit die für SBP erarbeiteten Zusammenhänge auf andere Pektine übertragen werden können.

Um strukturell unterschiedliche SBP untersuchen zu können, wurden zunächst verschiedene Extraktionsmethoden und Extraktionsbedingungen etabliert. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf solchen Methoden, die hohe Ausbeuten bei gleichzeitig geringfügiger Modifikation der nativen Pektinstruktur ermöglichen. Bei der Entwicklung der Extraktionsmethoden konnte für SBP gezeigt werden, dass nicht nur die Hauptextraktionsparameter Temperatur, Zeit und pH-Wert Auswirkungen auf die extrahierten Pektine haben, sondern auch die Probenvorbereitung. So konnte gezeigt werden, dass im Labormaßstab eine vorhergehende Zerkleinerung und Quellung des Ausgangsmaterials höhere Extraktionsausbeuten ermöglichen.

Basierend auf der optimierten Probenvorbereitung wurden verschiedene Extraktionsmethoden angewandt, um strukturell diverse Pektine zu produzieren. In dieser Arbeit wurden die meisten SBP durch den Einsatz des klassischen Säureextraktionsprozesses gewonnen und mithilfe verschiedener analytischer Verfahren (u.a. SEC-RI/UV/MALS, HPLC-DAD/FLD, HPAEC-PAD/MS, GC-FID/MS, $^1\text{H-NMR}$) im Detail charakterisiert. Die Pektinausbeute zeigte dabei eine deutliche Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen. So reichten bei hoher Säurekonzentration bereits kurze Extraktionszeiten aus, um gute Ausbeuten zu erzielen, während bei niedrigerer Säurekonzentration erst stark verlängerte Extraktionszeiten in hinreichenden Ausbeuten resultierten. Strukturell waren säureextrahierte SBP, die unter Anwendung milderer Extraktionsbedingungen gewonnen wurden, durch höhere mittlere Molekulargewichte (M_w), Acetylierungsgrade, *trans*-Ferulasäuregehalte sowie durch erheblich höhere Anteile an neutralen

5 Zusammenfassung

Seitenketten gekennzeichnet. Neben dem Vorkommen von Typ I- und Typ-II-Arabinogalactan Motiven handelt es sich dabei insbesondere um hochverzweigte Arabinanstrukturen. Die Gesamtheit der Ergebnisse verdeutlicht die Komplexität der nativ vorliegenden Molekülstruktur von SBP und dass die Anwendung industriell üblicher, harscher Säureextraktionsmethoden in einer erheblichen strukturellen Modifizierung resultiert. Die durch die unterschiedlichen Extraktionsbedingungen induzierten Strukturmodifikationen wirkten sich auch maßgeblich auf die Emulgiereigenschaften aus. SBP, die unter milderen Extraktionsbedingungen (niedrigere Säurekonzentration, kürzere Extraktionsperioden) gewonnen wurden, wiesen tendenziell bessere Emulgiereigenschaften auf als Pektine, die unter entsprechend harscheren Bedingungen extrahiert wurden.

Zur Extraktion von Pektinen wurden neben Säureextraktionen auch Autoklavenbehandlungen sowie kombinierte, enzymunterstützte Verfahren durchgeführt. Durch den Einsatz eines Cellulase-Präparats konnte die bei milden Säureextraktionen erzielte Pektinausbeute gesteigert werden, ohne dabei die Emulgiereigenschaften zu beeinträchtigen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durch den enzymatischen Verdau freigesetzten Pektine bei vergleichbarer Monosaccharidzusammensetzung durch höhere Molekulargewichte (Gewichtsmittel, M_w) und *trans*-Ferulasäuregehalte gekennzeichnet sind. Dementsprechend kann darauf geschlossen werden, dass die stärker in den Zellwandkomplex eingebetteten Pektine aus Zuckerrüben komplexere Strukturen aufweisen als die leichter extrahierbaren Pektinfraktionen. Die Autoklavenextraktion stellt ebenfalls eine vielversprechende Alternative zur klassischen Säureextraktion dar, da auch ohne Säurezugabe in kurzer Zeit hohe Pektinausbeuten erzielt werden konnten. Mit zunehmender Extraktionszeit zeigte sich jedoch eine drastische Zunahme der stabilisierten Tropfendurchmesser, sodass lediglich bei kurzen Extraktionszeiten SBP mit guten Emulgiereigenschaften extrahiert werden können.

Zur Ergründung kausaler Struktur-Eigenschaftszusammenhänge wurde in dieser Arbeit ein kombinierter Ansatz aus empirischen Struktur-Eigenschaftskorrelationen und gezielten Strukturmodifikationen gewählt. Dabei wurden zur Aufstellung der Struktur-Eigenschaftskorrelationen 43 SBP untersucht, die die strukturelle Bandbreite von gering bis hin zu stark modifizierten Pektinen abbildeten, sodass erstmals ein umfassender Einblick in die Struktur-Eigenschaftszusammenhänge säureextrahierter SBP ermöglicht wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Anteil arabinosehaltiger Seitenketten über den gesamten untersuchten Bereich hinweg linear mit der Emulsionstropfengröße korrelierte, während bei den weiteren Strukturparametern (Anteil galactosehaltiger Seitenketten, Galacturonsäuregehalt, *trans*-Ferulasäuregehalt, M_w , Methylierungs- und Acetylierungsgrad) kein eindeutiger Zusammenhang beobachtet werden konnte. SBP mit erhöhten Proteingehalten wiesen tendenziell schlechtere Emulgiereigenschaften auf. Diese Beobachtung war insofern bemerkenswert, dass der erhöhte Proteingehalt häufig als einer der Gründe für die guten Emulgiereigenschaften von SBP angeführt wird.

Die beobachteten Struktur-Eigenschaftskorrelationen konnten durch die gezielte strukturelle Modifikation eines mild säureextrahierten SBP mittels spezifischer Enzyme überprüft und konkretisiert werden. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass sich weder eine partielle Reduktion des Proteingehalts noch eine durch vereinzelte Spaltungen innerhalb des Galacturonanrückgrats bewirkte geringfügige Verringerung des M_w auf die Emulgierereigenschaften auswirkt. Darüber hinaus konnten gegensätzliche Einflüsse der neutralen Seitenketten bestätigt werden; während eine partielle Abspaltung von Galactanen keine Auswirkungen auf die Emulsionstropfengröße hatte, wirkte sich eine Modifizierung der Arabinanfraktion negativ auf die Emulgierereigenschaften aus. Zudem konnte durch den Einsatz unterschiedlicher arabinanmodifizierender Enzyme gezeigt werden, dass nicht nur der Anteil an Arabinanen, sondern auch deren struktureller Aufbau und insbesondere die Kettenlänge maßgeblichen Einfluss auf die Emulgierereigenschaften von säureextrahierten SBP hat.

Diese Struktur-Eigenschaftszusammenhänge konnten bei säureextrahierten (pH 2 - 4) SBP beobachtet werden, da diese stets durch hinreichende Proteingehalte gekennzeichnet waren und eine gewisse Mindestgröße bzw. ein Mindestmolekulargewicht nicht unterschritten. Werden diese Anforderungen nicht erfüllt, beispielsweise durch eine weitgehende Modifizierung des Galacturonanrückgrats im Zuge einer Autoklavenextraktion oder durch einen gezielten und nahezu vollständigen enzymatischen Proteinabbau, dann werden die Emulgierereigenschaften durch diese Strukturmodifikationen dominiert, sodass der Einfluss des Anteils oder der strukturellen Zusammensetzung der Arabinanseitenketten vernachlässigbar ist.

Bei der Analyse von Pektinen, die aus weiteren pflanzlichen Rohstoffen unter identischen Bedingungen wie SBP extrahiert wurden, zeigten sich teilweise stark abweichende strukturelle Zusammensetzungen im Vergleich zu SBP, die sich auch in unterschiedlichen Emulgierereigenschaften widerspiegelten. SBP und, mit Abstrichen, Karottenpektine wiesen dabei deutlich bessere Emulgierereigenschaften auf als Apfel-, Citrus-, Weintrauben- und Kartoffelpektine. Weintraubenpektine unterscheiden sich zu SBP insbesondere durch die deutlich niedrigeren M_w und Acetylierungsgrade sowie die fehlende Ferulasäuresubstitution der neutralen Seitenketten. Diese strukturellen Unterschiede sind vermutlich ursächlich dafür, dass bei Weintraubenpektinen im Gegensatz zu SBP keine direkte Abhängigkeit der Emulgierereigenschaften von der Arabinanfraktion beobachtet werden konnte. Insgesamt konnten für Pektine, die mittels unterschiedlicher Extraktionsmethoden aus Weintraubentrestern verschiedener Rebsorten gewonnen wurden, keine eindeutigen Struktur-Eigenschaftszusammenhänge festgestellt werden. Die Kombination aus, im Vergleich zu SBP, mäßiger Ausbeute und schlechteren Emulgierereigenschaften lässt auf ein geringeres kommerzielles Potential schließen. Vielversprechender erscheint der Einsatz von Pektinen, die aus Karottentrestern extrahiert werden. Um deren Potential als Emulgator besser einschätzen zu können, sind jedoch weitergehende Arbeiten zu den Struktur-Eigenschaftszusammenhängen notwendig.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABOU-ELSEOUD, W., HASSAN, E., HASSAN, M. (2021). Extraction of pectin from sugar beet pulp by enzymatic and ultrasound-assisted treatments. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 2, 100042.
- AI, C., MENG, H., LIN, J., TANG, X., GUO, X. (2022). Emulsification properties of alkaline soluble polysaccharide from sugar beet pulp: effect of acetylation and methoxylation. *Food Hydrocolloids* 124, 107361.
- AKHTAR, M., DICKINSON, E., MAZOYER, J., LANGENDORFF, V. (2002). Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. *Food Hydrocolloids* 16, 249 - 256.
- ALBERSHEIM, P. (1959). Instability of pectin in neutral solutions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1, 253 - 256.
- ALBERSHEIM, P., NEUKOM, H., DEUEL, H. (1960). Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 90, 46 - 51.
- AL-TAMIMI, M., PALFRAMAN, R., COOPER, J., GIBSON, G., RASTALL, R. (2006). *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology* 100, 407 - 414.
- AXELOS, M., THIBAUT, J. (1991). Influence of the substituents of the carboxyl groups and of the rhamnose content on the solution properties and flexibility of pectins. *International Journal of Biological Macromolecules* 13, 77 - 82.
- BAYE, K., GUYOT, J.-P., MOUQUET-RIVIER, C. (2017). The unresolved role of dietary fibers on mineral absorption. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57, 949 - 957.
- BECKER, A. (2020). Kombinierte Trocknungsverfahren und ihr Einfluss auf ausgewählte Inhaltsstoffe und Zellwandpolysaccharide von Obst und Gemüse. Dissertationsschrift. Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.
- BÉDOUET, L., COURTOIS, B., COURTOIS, J. (2003). Rapid quantification of O-acetyl and O-methyl residues in pectin extracts. *Carbohydrate Research* 338, 379 - 383.
- BEMILLER, J. (1967). Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. In: Wolfrom, M. und Tipson, R. (Hg.). *Advances in carbohydrate chemistry*, Bd. 22, Academic Press, 25 - 108.
- BEMILLER, J., KUMARI, G. (1972). β -elimination in uronic acids: evidence for an E1cB mechanism. *Carbohydrate Research* 25, 419 - 428.
- BENDER, C., STOLL, D., HUCH, M., WEINERT, C., DÖTSCH, A., DRÄGER, H., KELLER, J., KULLING, S., BUNZEL, M. (2023). Time-dependent fermentation of different structural units of commercial pectins with intestinal bacteria. *Carbohydrate Polymers* 308, 120642.
- BIBETTE, J., CALDERON, F., POULIN, P. (1999). Emulsions: basic principles. *Reports on Progress in Physics* 62, 969 - 1033.
- BIDLINGMEYER, B., COHEN, S., TARVIN, T. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 336, 93 - 104.

6 Literaturverzeichnis

- BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., VAN DER SCHAAF, U. (2023). Sugar beet pectins for the formulation of dressings and soft drinks: understanding the complexity of charged hydrocolloids in industrial food emulsions. *Food Hydrocolloids* 135, 108054.
- BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., ZAHN, K., VAN DER SCHAAF, U. (2022). Effect of conformation of sugar beet pectin on the interfacial and emulsifying properties. *Foods* 11, 214.
- BITTER, T., MUIR, H. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry* 4, 330 - 334.
- BJÖRNDAL, H., HELLERQVIST, C., LINDBERG, B., SVENSSON, S. (1970). Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. *Angewandte Chemie International Edition* 9, 610 - 619.
- BJÖRNDAL, H., LINDBERG, B., SVENSSON, S. (1967). Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carbohydrate Research* 5, 433 - 440.
- BLAKENEY, A., HARRIS, P., HENRY, R., STONE, B. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113, 291 - 299.
- BLUMENKRANTZ, N., ASBOE-HANSEN, G. (1973). New method for quantitative-determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484 - 489.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248 - 254.
- BRUMMELL, D. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33, 103 - 119.
- BUNZEL, M., RALPH, J., FUNK, C., STEINHART, H. (2005a). Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Letters* 46, 5845 - 5850.
- BUNZEL, M., RALPH, J., MARITA, J., HATFIELD, R., STEINHART, H. (2001). Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 653 - 660.
- BUNZEL, M., RALPH, J., STEINHART, H. (2005b). Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Molecular Nutrition & Food Research* 49, 551 - 559.
- BURKITT, D., WALKER, A., PAINTER, N. (1972). Effect of dietary fibre on stools and the transit-times, and its role in the causation of disease. *Lancet* 2, 1408 - 1412.
- CAFFALL, K., MOHNEN, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344, 1879 - 1900.
- CARDOSO, S., SILVA, A., COIMBRA, M. (2002). Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. *Carbohydrate Research* 337, 917 - 924.
- CARPITA, N., GIBEAUT, D. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3, 1 - 30.
- CCRC. The CCRC spectral database for PMAA's. University of Georgia, Athens, GA, USA. Online verfügbar unter <https://glygen.ccrcc.uga.edu/ccrc/specdb/ms/pmaa/pframe.html>, zuletzt geprüft am 10.06.2023.

- CHAMP, M., LANGKILDE, A.-M., BROUNS, F., KETTLITZ, B., LE COLLET, Y. (2003). Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects. *Nutrition Research Reviews* 16, 71 - 82.
- CHATJIGAKIS, A., PAPPAS, C., PROXENIA, N., KALANTZI, O., RODIS, P., POLISSIOU, M. (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers* 37, 395 - 408.
- CHEN, H., FU, X., LUO, Z. (2015). Properties and extraction of pectin-enriched materials from sugar beet pulp by ultrasonic-assisted treatment combined with subcritical water. *Food Chemistry* 168, 302 - 310.
- CHEN, H., FU, X., LUO, Z. (2016a). Effect of molecular structure on emulsifying properties of sugar beet pulp pectin. *Food Hydrocolloids* 54, 99 - 106.
- CHEN, H., QIU, S., GAN, J., LIU, Y., ZHU, Q., YIN, L. (2016b). New insights into the functionality of protein to the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids* 57, 262 - 270.
- CIUCANU, I., KEREK, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* 131, 209 - 217.
- COENEN, G., BAKX, E., VERHOEF, R., SCHOLS, H., VORAGEN, A. (2007). Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers* 70, 224 - 235.
- COHEN, S., DEANTONIS, K. (1994). Applications of amino-acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate - analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *Journal of Chromatography A* 661, 25 - 34.
- COHEN, S., MICHAUD, D. (1993). Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino-acids via high-performance liquid-chromatography. *Analytical Biochemistry* 211, 279 - 287.
- COLODEL, C., VRIESMANN, L., TEOFILLO, R., PETKOWICZ, C. (2018). Extraction of pectin from ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) peel: optimization and structural characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 117, 385 - 391.
- COLQUHOUN, I., RALET, M., THIBAUT, J., FAULDS, C., WILLIAMSON, G. (1994). Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR-spectroscopy. *Carbohydrate Research* 263, 243 - 256.
- CUMMINGS, J., POMARE, E., BRANCH, W., NAYLOR, C., MACFARLANE, G. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221 - 1227.
- CUQ, J., CHEFTEL, J. (1983). Tryptophan degradation during heat treatments: part 1 - the degradation of free tryptophan. *Food Chemistry* 12, 1 - 14.
- DAHER, F., BRAYBROOK, S. (2015). How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Frontiers in Plant Science* 6, 523.
- DE RUITER, G., SCHOLS, H., VORAGEN, A., ROMBOUTS, F. (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 4 other methods. *Analytical Biochemistry* 207, 176 - 185.
- DE VRIES, J., ROMBOUTS, F., VORAGEN, A., PILNIK, W. (1982). Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers* 2, 25 - 33.

6 Literaturverzeichnis

- DE VRIES, R., VAN KUYK, P., KESTER, H., VISSER, J. (2002). The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochemical Journal* 363, 377 - 386.
- DEA, I., MADDEN, J. (1986). Acetylated pectic polysaccharides of sugar beet. *Food Hydrocolloids* 1, 71 - 88.
- DEBYE, P. (1947). Molecular-weight determination by light scattering. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry* 51, 18 - 32.
- DGE (2021). Richtwerte für die Ballaststoffzufuhr. Online verfügbar unter <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/ballaststoffe>, zuletzt geprüft am 10.06.2023.
- DISCHE, Z. (1947). A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry* 167, 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, 8927 - 8935.
- DUMAS, J. (1831). Procédes de l'analyse organique. *Annales de Chimie et de Physique* 247, 198 - 213.
- EBRINGEROVÁ, A. (2005). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia* 232, 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, 542 - 556.
- EL-NAWAWI, S., HEIKAL, Y. (1995). Production of a low ester pectin by de-esterification of high ester citrus pectin. *Carbohydrate Polymers* 27, 191 - 195.
- ERIKSSON, I., ANDERSSON, R., WESTERLUND, E., AMAN, P. (1996). Structural features of an arabinan fragment isolated from the water-soluble fraction of dehulled rapeseed. *Carbohydrate Research* 281, 161 - 172.
- FAO (2021). FAOSTAT statistical database. Online verfügbar unter <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>, zuletzt geprüft am 10.06.2023.
- FEI (2021). Abschlussbericht Projekt "Proteinreiche Pektine" (AiF 20218 N). Online verfügbar unter <https://www.fei-bonn.de/geoerderte-projekte/projekt Datenbank/aif-20218-n.projekt>, zuletzt geprüft am 10.06.2023.
- FEKKES, D. (1996). State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 682, 3 - 22.
- FERREIRA-LAZARTE, A., KACHRIMANIDOU, V., VILLAMIEL, M., RASTALL, R., MORENO, F. (2018). *In vitro* fermentation properties of pectins and enzymatic-modified pectins obtained from different renewable bioresources. *Carbohydrate Polymers* 199, 482 - 491.
- FILISSETTI-COZZI, T., CARPITA, N. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* 197, 157 - 162.

- FISHMAN, M., CHAU, H., QI, P., HOTCHKISS, A., YADAV, M. (2013). Physico-chemical characterization of protein-associated polysaccharides extracted from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers* 92, 2257 - 2266.
- FOUNTOULAKIS, M., LAHM, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A* 826, 109 - 134.
- FROST, G., SLEETH, M., SAHURI-ARISOYLU, M., LIZARBE, B., CERDAN, S., BRODY, L., ANASTASOVSKA, J., GHOURAB, S., HANKIR, M., ZHANG, S., CARLING, D., SWANN, J., GIBSON, G., VIARDOT, A., MORRISON, D., LOUISE THOMAS, E., BELL, J. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications* 5, 3611.
- FRY, S. (1983). Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta* 157, 111 - 123.
- FRY, S. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology* 37, 165 - 186.
- FRY, S. (1989). The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany* 40, 1 - 11.
- FUNAMI, T., NAKAUMA, M., ISHIHARA, S., TANAKA, R., INOUE, T., PHILLIPS, G. (2011). Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality. *Food Hydrocolloids* 25, 221 - 229.
- FUNAMI, T., ZHANG, G., HIROE, M., NODA, S., NAKAUMA, M., ASAI, I., COWMAN, M., AL-ASSAF, S., PHILLIPS, G. (2007). Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids* 21, 1319 - 1329.
- GALAMBOS, J. (1967). The reaction of carbazole with carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 19, 119 - 132.
- GASPAR, Y., JOHNSON, K., MCKENNA, J., BACIC, A., SCHULTZ, C. (2001). The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology* 47, 161 - 176.
- GIDLEY, M., GRANT REID, J. (2006). Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: Stephen, A., Phillips, G. und Williams, P. (Hg.). *Food polysaccharides and their applications*, CRC Press, 181 - 215.
- GNIECHWITZ, D., REICHARDT, N., BLAUT, M., STEINHART, H., BUNZEL, M. (2007). Dietary fiber from coffee beverage: degradation by human fecal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6989 - 6996.
- GOU, J.-Y., MILLER, L., HOU, G., YU, X.-H., CHEN, X.-Y., LIU, C.-J. (2012). Acetyltransferase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *Plant Cell* 24, 50 - 65.
- GRANT, G., MORRIS, E., REES, D., SMITH, P., THOM, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters* 32, 195 - 198.
- GUILLOIN, F., THIBAUT, J. (1989). Structural investigation of the neutral sugar side-chains of sugar-beet pectins. 1. Methylation analysis and mild acid-hydrolysis of the hairy fragments of sugar-beet pectins. *Carbohydrate Research* 190, 85 - 96.
- GUO, X., GUO, X., YU, S., KONG, F. (2018). Influences of the different chemical components of sugar beet pectin on the emulsifying performance of conjugates formed between sugar beet pectin and whey protein isolate. *Food Hydrocolloids* 82, 1 - 10.

6 Literaturverzeichnis

- GWATIDZO, L., BOTHA, B., MCCRINDLE, R. (2013). Determination of amino acid contents of manketti seeds (*Schinziophyton rautanenii*) by pre-column derivatisation with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate and RP-HPLC. *Food Chemistry* 141, 2163 - 2169.
- HAKOMORI, S.-I. (1964). A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *The Journal of Biochemistry* 55, 205 - 208.
- HAMILTON, P. (1963). Ion exchange chromatography of amino acids. A single column, high resolving, fully automatic procedure. *Analytical Chemistry* 35, 2055 - 2064.
- HARRIS, P., SMITH, B. (2006). Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 129 - 143.
- HART, D., KINDEL, P. (1970). A novel reaction involved in the degradation of apiogalacturonans from *Lemna minor* and the isolation of apibiose as a product. *Biochemistry* 9, 2190 - 2196.
- HARTLEY, R., HARRIS, P. (1981). Phenolic constituents of the cell walls of dicotyledons. *Biochemical Systematics and Ecology* 9, 189 - 203.
- HERI, W., NEUKOM, H., DEUEL, H. (1961a). Chromatographie von Pektinen mit verschiedener Verteilung der Methylester-Gruppen auf den Fadenmolekeln. 16. Mitteilung über Ionenaustauscher. *Helvetica Chimica Acta* 44, 1945 - 1949.
- HERI, W., NEUKOM, H., DEUEL, H. (1961b). Chromatographische Fraktionierung von Pektinstoffen an Diäthylaminoäthyl-Cellulose. 15. Mitteilung über Ionenaustauscher. *Helvetica Chimica Acta* 44, 1939 - 1945.
- HILZ, H., BAKX, E., SCHOLS, H., VORAGEN, A. (2005). Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries - characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers* 59, 477 - 488.
- HINZ, S., VERHOEF, R., SCHOLS, H., VINCKEN, J.-P., VORAGEN, A. (2005). Type I arabinogalactan contains β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp structural elements. *Carbohydrate Research* 340, 2135 - 2143.
- HOLCK, J., LORENTZEN, A., VIGSNÆS, L., LICHT, T., MIKKELSEN, J., MEYER, A. (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, 6511 - 6519.
- HOLT, S., HEADING, R., CARTER, D., PRESCOTT, L., TOTHILL, P. (1979). Effect of gel fibre on gastric emptying and absorption of glucose and paracetamol. *Lancet* 1, 636 - 639.
- HOWLETT, J., BETTERIDGE, V., CHAMP, M., CRAIG, S., MEHEUST, A., JONES, J. (2010). The definition of dietary fiber - discussions at the Ninth Vahouny Fiber Symposium: building scientific agreement. *Food & Nutrition Research* 54.
- HUISMAN, M., BRÜL, L., THOMAS-OATES, J., HAVERKAMP, J., SCHOLS, H., VORAGEN, A. (2001). The occurrence of internal (1 \rightarrow 5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research* 330, 103 - 114.
- HUNTER, J., WICKER, L. (2005). De-esterification of pectin by alkali, plant and fungal pectinmethylesterases and effect on molecular weight. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 2243 - 2248.
- IMMERZEEL, P., EPPINK, M., VRIES, S. DE, SCHOLS, H., VORAGEN, A. (2006). Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiologia Plantarum* 128, 18 - 28.

- ISHII, T., MATSUNAGA, T. (1996). Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydrate Research* 284, 1 - 9.
- ISHII, T., MATSUNAGA, T. (2001). Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry* 57, 969 - 974.
- ISHII, T., MATSUNAGA, T., PELLERIN, P., O'NEILL, M., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P. (1999). The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13098 - 13104.
- IZUNOBI, J., HIGGINBOTHAM, C. (2011). Polymer molecular weight analysis by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Chemical Education* 88, 1098 - 1104.
- JENKINS, D., NEWTON, C., LEEDS, A., CUMMINGS, J. (1975). Effect of pectin, guar gum, and wheat fibre on serum-cholesterol. *Lancet* 1, 1116 - 1117.
- JILEK, M., BUNZEL, M. (2013). Dehydrotriferulic and dehydrodiferulic acid profiles of cereal and pseudocereal flours. *Cereal Chemistry* 90, 507 - 514.
- JUNG, J., WICKER, L. (2012). Laccase mediated conjugation of sugar beet pectin and the effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids* 28, 168 - 173.
- JUNG, S., RICKERT, D., DEAK, N., ALDIN, E., RECKNOR, J., JOHNSON, L., MURPHY, P. (2003). Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80, 1169 - 1173.
- 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.
- KAHNT, G. (1967). *Trans-cis*-equilibrium of hydroxycinnamic acids during irradiation of aqueous solutions at different pH. *Phytochemistry* 6, 755 - 758.
- KAMBHAMPATI, S., LI, J., EVANS, B., ALLEN, D. (2019). Accurate and efficient amino acid analysis for protein quantification using hydrophilic interaction chromatography coupled tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 15, 46.
- KAPOOR, V., TARAVEL, F., JOSELEAU, J., MILAS, M., CHANZY, H., RINAUDO, M. (1998). *Cassia spectabilis* DC seed galactomannan: structural, crystallographical and rheological studies. *Carbohydrate Research* 306, 231 - 241.
- KARBSTEIN, H., SCHUBERT, H. (1995). Einflußparameter auf die Auswahl einer Maschine zum Erzeugen feindisperser O/W-Emulsionen. *Chemie Ingenieur Technik* 67, 616 - 619.
- KARNIK, D., JUNG, J., HAWKING, S., WICKER, L. (2016). Sugar beet pectin fractionated using isopropanol differs in galacturonic acid, protein, ferulic acid and surface hydrophobicity. *Food Hydrocolloids* 60, 179 - 185.
- KENDALL, C., ESFAHANI, A., JENKINS, D. (2010). The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids* 24, 42 - 48.
- KIM, Y., YOO, Y.-H., KIM, K.-O., PARK, J.-B., YOO, S.-H. (2008). Textural properties of gelling system of low-methoxy pectins produced by demethoxylating reaction of pectin methyl esterase. *Journal of food science* 73, C367-72.
- KINTNER, P., VAN BUREN, J. (1982). Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the *m*-hydroxydiphenyl method. *Journal of Food Science* 47, 756 - 759.

6 Literaturverzeichnis

- KIRBY, A., MACDOUGALL, A., MORRIS, V. (2006). Sugar beet pectin-protein complexes. *Food Biophysics* 1, 51 - 56.
- KIRBY, A., MACDOUGALL, A., MORRIS, V. (2008). Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules. *Carbohydrate Polymers* 71, 640 - 647.
- KIRTCEV, N., PANCHEV, I., KRATCHANOV, C. (1989). Kinetics of acid-catalysed de-esterification of pectin in a heterogeneous medium. *International Journal of Food Science and Technology* 24, 479 - 486.
- KJELDAHL, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* 22, 366 - 382.
- KLEMM, D., HEUBLEIN, B., FINK, H.-P., BOHN, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition* 44, 3358 - 3393.
- KOMALAVILAS, P., MORT, A. (1989). The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydrate Research* 189, 261 - 272.
- KPODO, F., AGBENORHEVI, J., ALBA, K., BINGHAM, R., ODURO, I., MORRIS, G., KONTOGIORGOS, V. (2017). Pectin isolation and characterization from six okra genotypes. *Food Hydrocolloids* 72, 323 - 330.
- KPODO, F., AGBENORHEVI, J., ALBA, K., ODURO, I., MORRIS, G., KONTOGIORGOS, V. (2018). Structure-function relationships in pectin emulsification. *Food Biophysics* 13, 71 - 79.
- KRAVTCHEV, T., ARNOULD, I., VORAGEN, A., PILNIK, W. (1992). Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical β -elimination in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* 19, 237 - 242.
- KRISTENSEN, M., JENSEN, M. (2011). Dietary fibres in the regulation of appetite and food intake. Importance of viscosity. *Appetite* 56, 65 - 70.
- KYOMUGASHO, C., CHRISTIAENS, S., SHPIGELMAN, A., VAN LOEY, A., HENDRICKX, M. (2015). FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. *Food Chemistry* 176, 82 - 90.
- LANSING, W., KRAEMER, E. (1935). Molecular weight analysis of mixtures by sedimentation equilibrium in the Svedberg ultracentrifuge. *Journal of the American Chemical Society* 57, 1369 - 1377.
- LARSEN, N., BUSSOLO DE SOUZA, C., KRYCH, L., BARBOSA CAHÚ, T., WIESE, M., KOT, W., HANSEN, K., BLENNOW, A., VENEMA, K., JESPERSEN, L. (2019). Potential of pectins to beneficially modulate the gut microbiota depends on their structural properties. *Frontiers in microbiology* 10, 223.
- LAUDAN, J. (2004). Untersuchung von ultrahochmolekularen Polymeren mittels asymmetrischer Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung und Lichtstreu-/Konzentrationsdetektor-Kombination. Dissertationsschrift. Universität Hamburg, Hamburg.
- LE GOFF, A., RENARD, C., BONNIN, E., THIBAUT, J.-F. (2001). Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers* 45, 325 - 334.
- LE ROUGE, P., O'NEILL, M., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P. (1993). Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research* 243, 359 - 371.

- LEROUX, J., LANGENDORFF, V., SCHICK, G., VAISHNAV, V., MAZOYER, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids* 17, 455 - 462.
- LEVIGNE, S., RALET, M., QUEMENER, B., POLLET, B., LAPIERRE, C., THIBAUT, J. (2004a). Isolation from sugar beet cell walls of arabinan oligosaccharides esterified by two ferulic acid monomers. *Plant Physiology* 134, 1173 - 1180.
- LEVIGNE, S., RALET, M., QUEMENER, B., THIBAUT, J. (2004b). Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls. *Carbohydrate Research* 339, 2315 - 2319.
- LEVIGNE, S., RALET, M., THIBAUT, J. (2002a). Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers* 49, 145 - 153.
- LEVIGNE, S., THOMAS, M., RALET, M., QUEMENER, B., THIBAUT, J. (2002b). Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids* 16, 547 - 550.
- LIEW, S., CHIN, N., YUSOF, Y., SOWNDHARARAJAN, K. (2016). Comparison of acidic and enzymatic pectin extraction from passion fruit peels and its gel properties. *Journal of Food Process Engineering* 39, 501 - 511.
- LIN, J., GUO, X., AI, C., ZHANG, T., YU, S. (2020a). Genipin crosslinked sugar beet pectin-whey protein isolate/bovine serum albumin conjugates with enhanced emulsifying properties. *Food Hydrocolloids* 105, 105802.
- LIN, J., YU, S., AI, C., ZHANG, T., GUO, X. (2020b). Emulsion stability of sugar beet pectin increased by genipin crosslinking. *Food Hydrocolloids* 101, 105459.
- LIN, S., AGGER, J., WILKENS, C., MEYER, A. (2021). Feruloylated arabinoxylan and oligosaccharides: chemistry, nutritional functions, and options for enzymatic modification. *Annual review of food science and technology* 12, 331 - 354.
- LIU, Z., PI, F., GUO, X., GUO, X., YU, S. (2019). Characterization of the structural and emulsifying properties of sugar beet pectins obtained by sequential extraction. *Food Hydrocolloids* 88, 31 - 42.
- LONGLAND, J., FRY, S., TREWAVAS, A. (1989). Developmental control of apiogalacturonan biosynthesis and UDP-apiose production in a duckweed. *Plant Physiology* 90, 972 - 976.
- MA, S., YU, S., ZHENG, X., WANG, X., BAO, Q., GUO, X. (2013). Extraction, characterization and spontaneous emulsifying properties of pectin from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers* 98, 750 - 753.
- MARIOTTI, F., TOMÉ, D., MIRAND, P. (2008). Converting nitrogen into protein - beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 177 - 184.
- MATSUHASHI, S., HATANAKA, C. (1992). Difference between the free and conjugated galacturonate residues in their color reaction with carbazole or *m*-hydroxybiphenyl reagents. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56, 1142 - 1143.
- Max Rubner-Institut (2008). Nationale Verzehrsstudie II - Ergebnisbericht Teil 2. Online verfügbar unter https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/NVS_ErgebnisberichtTeil2.html, zuletzt geprüft am 10.06.2023.

6 Literaturverzeichnis

- MCCLEARY, B. (2018). Total dietary fiber (CODEX definition) in foods and food ingredients by a rapid enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study, first action 2017.16. *Journal of AOAC International* 102, 196 - 207.
- MCCLEARY, B., MCLOUGHLIN, C. (2022). Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods using a rapid integrated procedure of enzymatic-gravimetric-liquid chromatography: first action 2022.01. *Journal of AOAC International* 106, 127 - 145.
- McClements, D. (2016). Food emulsions - principles, practices, and techniques. 3. Auflage. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- MCDUGALL, G., MORRISON, I., STEWART, D., HILLMAN, J. (1996). Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 133 - 150.
- MCKENZIE, H., WALLACE, H. (1954). The Kjeldahl determination of nitrogen: a critical study of digestion conditions - temperature, catalyst, and oxidizing agent. *Australian Journal of Chemistry* 7, 55.
- MCKENZIE, L., YOUNG, P. (1975). Determination of ammonia-, nitrate- and organic nitrogen in water and waste water with an ammonia gas-sensing electrode. *The Analyst* 100, 620 - 628.
- MCNEIL, M., DARVILL, A., FRY, S., ALBERSHEIM, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry* 53, 625 - 663.
- MESTER, Z., STURGEON, R., PAWLISZYN, J. (2001). Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 56, 233 - 260.
- MOHAMED, S., CHRISTENSEN, T., MIKKELSEN, J. (2003). New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. *Carbohydrate Research* 338, 515 - 524.
- MOHNEN, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 266 - 277.
- MOORE, S., SPACKMAN, D., STEIN, W. (1958). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Analytical Chemistry* 30, 1185 - 1190.
- MOORE, S., STEIN, W. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry* 176, 367 - 388.
- MOREIRA, L., FILHO, E. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 165 - 178.
- MORRIS, E., POWELL, D., GIDLEY, M., REES, D. (1982). Conformations and interactions of pectins. I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *Journal of Molecular Biology* 155, 507 - 516.
- MORT, A., ZHENG, Y., QIU, F., NIMTZ, M., BELL-EUNICE, G. (2008). Structure of xylogalacturonan fragments from watermelon cell-wall pectin. Endopolygalacturonase can accommodate a xylosyl residue on the galacturonic acid just following the hydrolysis site. *Carbohydrate Research* 343, 1212 - 1221.
- 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, 9081 - 9087.

- NAKAMURA, A., FURUTA, H., MAEDA, H., TAKAO, T., NAGAMATSU, Y. (2002). Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66, 1155 - 1158.
- NAKAUMA, M., FUNAMI, T., NODA, S., ISHIHARA, S., AL-ASSAF, S., NISHINARI, K., PHILLIPS, G. (2008). Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum arabic as food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties. *Food Hydrocolloids* 22, 1254 - 1267.
- NEUMÜLLER, K., CARVALHO DE SOUZA, A., VAN RIJN, J., APPELDOORN, M., STREEKSTRA, H., SCHOLS, H., GRUPPEN, H. (2013). Fast and robust method to determine phenoyl and acetyl esters of polysaccharides by quantitative ^1H NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 6282 - 6287.
- NGUEMA-ONA, E., MOORE, J., FAGERSTRÖM, A., FANGEL, J., WILLATS, W., HUGO, A., VIVIER, M. (2012). Profiling the main cell wall polysaccharides of tobacco leaves using high-throughput and fractionation techniques. *Carbohydrate Polymers* 88, 939 - 949.
- NIU, H., CHEN, X., LUO, T., CHEN, H., FU, X. (2022). The interfacial behavior and long-term stability of emulsions stabilized by gum arabic and sugar beet pectin. *Carbohydrate Polymers* 291, 119623.
- NUNES, C., ROCHA, S., SARAIVA, J., COIMBRA, M. (2006). Simple and solvent-free methodology for simultaneous quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID). *Carbohydrate Polymers* 64, 306 - 311.
- NUNES, F., COIMBRA, M. (2001). Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1773 - 1782.
- ØBRO, J., HARHOLT, J., SCHELLER, H., ORFILA, C. (2004). Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. *Phytochemistry* 65, 1429 - 1438.
- OECHSLIN, R., LUTZ, M., AMADÒ, R. (2003). Pectic substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterisation of a new type of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Polymers* 51, 301 - 310.
- OLANO-MARTIN, E., GIBSON, G., RASTELL, R. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 93, 505 - 511.
- O'NEILL, M., EBERHARD, S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. (2001). Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 294, 846 - 849.
- O'NEILL, M., ISHII, T., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. (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. (2011). Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5747 - 5754.
- OOSTERVELD, A., BELDMAN, G., SCHOLS, H. (1996). Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research* 288, 143 - 153.

6 Literaturverzeichnis

- OOSTERVELD, A., BELDMAN, G., SCHOLS, H., VORAGEN, A. (2000a). Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research* 328, 185 - 197.
- OOSTERVELD, A., BELDMAN, G., Searle-Van Leeuwen, M. J. F., VORAGEN, A. (2000b). Effect of enzymatic deacetylation on gelation of sugar beet pectin in the presence of calcium. *Carbohydrate Polymers* 43, 249 - 256.
- OOSTERVELD, A., BELDMAN, G., VORAGEN, A. (2000c). Oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research* 328, 199 - 207.
- OOSTERVELD, A., VORAGEN, A., SCHOLS, H. (2002). Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Polymers* 49, 407 - 413.
- O'SULLIVAN, A. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173 - 207.
- OZTURK, B., MCCLEMENTS, D. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science* 7, 1 - 6.
- PACKERT, M., STEINHART, H. (1995). Separation and identification of some monomeric and dimeric phenolic acids by a simple gas chromatographic method using a capillary column and FID-MSD. *Journal of Chromatographic Science* 33, 631 - 639.
- PARKER, M., NG, A., WALDRON, K. (2005). The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 2539 - 2547.
- PETTOLINO, F., WALSH, C., FINCHER, G., BACIC, A. (2012). Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols* 7, 1590 - 1607.
- PFEFFERKORN, P. (2004). Analytik von wasserlöslichen Polysacchariden und Polysaccharidderivaten mittels Größenausschlusschromatographie kombiniert mit Vielwinkellaserlichtstreuung und Konzentrationsdetektion. Dissertationsschrift. Universität Hamburg, Hamburg.
- PIPPEN, E., MCCREADY, R., OWENS, H. (1950). Gelation properties of partially acetylated pectins. *Journal of the American Chemical Society* 72, 813 - 816.
- QI, P., XIAO, Y., WICKHAM, E. (2017). Changes in physical, chemical and functional properties of whey protein isolate (WPI) and sugar beet pectin (SBP) conjugates formed by controlled dry-heating. *Food Hydrocolloids* 69, 86 - 96.
- RALET, M., AXELOS, M., THIBAUT, J. (1994a). Gelation properties of extruded lemon cell-walls and their water-soluble pectins. *Carbohydrate Research* 260, 271 - 282.
- RALET, M., THIBAUT, J., FAULDS, C., WILLIAMSON, G. (1994b). Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell-walls of sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research* 263, 227 - 241.
- RALET, M.-C., ANDRÉ-LEROUX, G., QUÉMENER, B., THIBAUT, J.-F. (2005). Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. *Phytochemistry* 66, 2800 - 2814.
- RALET, M.-C., THIBAUT, J.-F. (1994). Extraction and characterisation of very highly methylated pectins from lemon cell walls. *Carbohydrate Research* 260, 283 - 296.
- REDGWELL, R., CURTI, D., FISCHER, M., NICOLAS, P., FAY, L. (2002). Coffee bean arabinogalactans: acidic polymers covalently linked to protein. *Carbohydrate Research* 337, 239 - 253.

- RENARD, C., CREPEAU, M., THIBAUT, J. (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry* 266, 566 - 574.
- RENARD, C., JARVIS, M. (1999). Acetylation and methylation of homogalacturonans 1: optimisation of the reaction and characterisation of the products. *Carbohydrate Polymers* 39, 201 - 207.
- RENARD, C., THIBAUT, J.-F. (1996). Degradation of pectins in alkaline conditions: kinetics of demethylation. *Carbohydrate Research* 286, 139 - 150.
- RENGER, A., STEINHART, H. (2000). Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *European Food Research and Technology* 211, 422 - 428.
- RIDLEY, B., O'NEILL, M., MOHNEN, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929 - 967.
- 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, 159 - 166.
- RIZZO, V., PINCIROLI, V. (2005). Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38, 851 - 857.
- ROMBOUTS, F., THIBAUT, J.-F. (1986). Enzymic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research* 154, 189 - 203.
- ROSENBOHM, C., LUNDT, I., CHRISTENSEN, T., YOUNG, N. (2003). Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. *Carbohydrate Research* 338, 637 - 649.
- ROUND, A., RIGBY, N., MACDOUGALL, A., MORRIS, V. (2010). A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research* 345, 487 - 497.
- ROUND, A., RIGBY, N., MACDOUGALL, A., RING, S., MORRIS, V. (2001). Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis. *Carbohydrate Research* 331, 337 - 342.
- SAEMAN, J. (1945). Kinetics of wood saccharification - hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Industrial & Engineering Chemistry* 37, 43 - 52.
- SAMEJIMA, K., DAIRMAN, W., UDENFRIEND, S. (1971). Condensation of ninhydrin with aldehydes and primary amines to yield highly fluorescent ternary products. *Analytical Biochemistry* 42, 222 - 236.
- SASSAKI, G., GORIN, P., SOUZA, L., CZELUSNIAK, P., 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, 731 - 739.
- SAVARY, B., 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, 151 - 159.
- SCHARLAU, D., BOROWICKI, A., HABERMANN, N., HOFMANN, T., KLENOW, S., MIENE, C., MUNJAL, U., STEIN, K., GLEI, M. (2009). Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutation Research* 682, 39 - 53.
- SHELLER, H., ULVSKOV, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263 - 289.

6 Literaturverzeichnis

- SCHENDEL, R., PUCHBAUER, A.-K., BUNZEL, M. (2016). Glycoside hydrolase family 51 α -L-arabinofuranosidases from *Clostridium thermocellum* and *Cellvibrio japonicus* release O-5-feruloylated arabinose. *Cereal Chemistry* 93, 650 - 653.
- SCHMIDT, U., KOCH, L., RENTSCHLER, C., KURZ, T., ENDRESS, H., SCHUCHMANN, H. (2015a). Effect of molecular weight reduction, acetylation and esterification on the emulsification properties of citrus pectin. *Food Biophysics* 10, 217 - 227.
- SCHMIDT, U., SCHMIDT, K., KURZ, T., ENDRESS, H., SCHUCHMANN, H. (2015b). Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions. *Food Hydrocolloids* 46, 59 - 66.
- SCHNEPF, L. (2020). Untersuchung der funktionellen Zusammenhänge zwischen Extraktionsbedingungen, molekularer Struktur und Emulgierereigenschaften von Pektinen. Masterarbeit. Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.
- SCHOLS, H., BAKX, E., SCHIPPER, D., VORAGEN, A. (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research* 279, 265 - 279.
- SCHOLS, H., POSTHUMUS, M., VORAGEN, A. (1990). Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydrate Research* 206, 117 - 129.
- SCHULTINK, A., LIU, L., ZHU, L., PAULY, M. (2014). Structural diversity and function of xyloglucan sidechain substituents. *Plants* 3, 526 - 542.
- SEN, A., MILLER, S., ARNASON, J., FULCHER, R. (1991). Quantitative determination by high performance liquid chromatography and microspectro-fluorimetry of phenolic acids in maize grain. *Phytochemical Analysis* 2, 225 - 229.
- SENGKHAMPARN, N., BAKX, E., VERHOEF, R., SCHOLS, H., SAJJAANANTAKUL, T., VORAGEN, A. (2009). Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and alpha-linked galactosyl groups. *Carbohydrate Research* 344, 1842 - 1851.
- SHIT, S., MAITI, S. (1986). Application of NMR spectroscopy in molecular weight determination of polymers. *European Polymer Journal* 22, 1001 - 1008.
- SHOWALTER, A. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9 - 23.
- SIEW, C., WILLIAMS, P. (2008). Role of protein and ferulic acid in the emulsification properties of sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4164 - 4171.
- SIEW, C., WILLIAMS, P., CUI, S., WANG, Q. (2008). Characterization of the surface-active components of sugar beet pectin and the hydrodynamic thickness of the adsorbed pectin layer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 8111 - 8120.
- SIMAT, T., KLEEBERG, K., MÜLLER, B., SIERTS, A. (2003). Contamination of commercially available L-tryptophan by related substances. *European Food Research and Technology* 216, 241 - 252.
- SIMONNE, A., SIMONNE, E., EITENMILLER, R., MILLS, H., CRESMAN, C. (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, 39 - 45.
- SIMONNE, E., HARRIS, C., MILLS, H. (1998). Does the nitrate fraction account for differences between Dumas-N and Kjeldahl-N values in vegetable leaves? *Journal of Plant Nutrition* 21, 2527 - 2534.

- SIMS, I., CARNACHAN, S., BELL, T., HINKLEY, S. (2018). Methylation analysis of polysaccharides: technical advice. *Carbohydrate Polymers* 188, 1 - 7.
- SOMMER-KNUDSEN, J., BACIC, A., CLARKE, A. (1998). Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry* 47, 483 - 497.
- SRIPERM, N., PESTI, G., TILLMAN, P. (2011). Evaluation of the fixed nitrogen-to-protein (N:P) conversion factor (6.25) versus ingredient specific N:P conversion factors in feedstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 1182 - 1186.
- STECK, J. (2020). Entwicklung und Anwendung analytischer Verfahren zur Strukturcharakterisierung von Ballaststoffpolymeren aus Beerenobst. Dissertationsschrift. Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe.
- STECK, J., KAUFHOLD, L., BUNZEL, M. (2021). Structural profiling of xyloglucans from food plants by high-performance anion-exchange chromatography with parallel pulsed amperometric and mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69, 8838 - 8849.
- SUN, H., WOOTEN, J., RYAN, W., BOKELMAN, G., ÅMAN, P. (1987). Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan. *Carbohydrate Polymers* 7, 143 - 158.
- SUN, R., HUGHES, S. (1998). Extraction and physico-chemical characterization of pectins from sugar beet pulp. *Polymer Journal* 30, 671 - 677.
- SWEET, D., SHAPIRO, R., ALBERSHEIM, P. (1975). Quantitative-analysis by various GLC response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydrate Research* 40, 217 - 225.
- TADROS, T. (2013). Emulsion formation, stability, and rheology. In: Tadros, T. (Hg.). Emulsion formation and stability, Bd. 14. Weinheim, Wiley-VCH, 1 - 75.
- TAN, L., EBERHARD, S., PATTATHIL, S., WARDER, C., GLUSHKA, J., YUAN, C., HAO, Z., ZHU, X., AVCI, U., MILLER, J., BALDWIN, D., PHAM, C., ORLANDO, R., DARVILL, A., HAHN, M., KIELISZEWSKI, M., MOHNEN, D. (2013). An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *Plant Cell* 25, 270 - 287.
- THAKUR, B., SINGH, R., HANDA, A. (1997). Chemistry and uses of pectin - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37, 47 - 73.
- THOMASSEN, L., VIGSNÆS, L., LICHT, T., MIKKELSEN, J., MEYER, A. (2011). Maximal release of highly bifidogenic soluble dietary fibers from industrial potato pulp by minimal enzymatic treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 873 - 884.
- TUOMIVAARA, S., YAOI, K., O'NEILL, M., YORK, W. (2015). Generation and structural validation of a library of diverse xyloglucan-derived oligosaccharides, including an update on xyloglucan nomenclature. *Carbohydrate Research* 402, 56 - 66.
- UDENFRIEND, S., STEIN, S., BÖHLEN, P., DAIRMAN, W., LEIMGRUBER, W., WEIGELE, M. (1972). Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science* 178, 871 - 872.
- URBAT, F., MULLER, 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, 127.

6 Literaturverzeichnis

- VAN DEN HOOGEN, B., VAN WEEREN, P., LOPES-CARDOZO, M., VAN GOLDE, L., BARNEVELD, A., VAN DE LEST, C. (1998). A microtiter plate assay for the determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 257, 107 - 111.
- VENTOURI, I., LOEBER, S., SOMSEN, G., SCHOENMAKERS, P., ASTEFANEI, A. (2022). Field-flow fractionation for molecular-interaction studies of labile and complex systems: a critical review. *Analytica Chimica Acta* 1193, 339396.
- VINCKEN, J., SCHOLS, H., Oomen, R. J. F. J., MCCANN, M., ULVSKOV, P., VORAGEN, A., VISSER, R. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* 132, 1781 - 1789.
- VOGEL, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 301 - 307.
- VORAGEN, A., COENEN, G., VERHOEF, R., SCHOLS, H. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* 20, 263 - 275.
- VORAGEN, A., SCHOLS, H., PILNIK, W. (1986). Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. *Food Hydrocolloids* 1, 65 - 70.
- WANG, Z., MENG, H., ZHANG, T., GUO, X. (2021). Investigation into the polymerization and changes of physicochemical properties of sugar beet pectin through controlled dry-heating. *Food Hydrocolloids* 110, 106212.
- WATERSTRAAT, M., BUNZEL, M. (2019). A stable isotope dilution approach to analyze ferulic acid oligomers in plant cell walls using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411, 5047 - 5062.
- WATSON, M., GALLIHER, T. (2001). Comparison of Dumas and Kjeldahl methods with automatic analyzers on agricultural samples under routine rapid analysis conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32, 2007 - 2019.
- WEFERS, D., BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., VAN DER SCHAAF, U. (2018). Whey protein-pectin conjugates: linking the improved emulsifying properties to molecular and physico-chemical characteristics. *Food Hydrocolloids* 85, 257 - 266.
- WEFERS, D., BUNZEL, M. (2015). Characterization of dietary fiber polysaccharides from dehulled common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Cereal Chemistry* 92, 598 - 603.
- 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, 4656 - 4664.
- WEFERS, D., BUNZEL, M. (2016b). NMR spectroscopic profiling of arabinan and galactan structural elements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 9559 - 9568.
- WEFERS, D., GMEINER, B., TYL, C., BUNZEL, M. (2015a). Characterization of diferuloylated pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD.). *Phytochemistry* 116, 320 - 328.
- WEFERS, D., TYL, C., BUNZEL, M. (2014). Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. *Frontiers in Chemistry* 2, 100.
- WEFERS, D., TYL, C., BUNZEL, M. (2015b). Neutral pectin side chains of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) contain long, partially branched arabinans and short galactans, both with terminal arabinopyranoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 707 - 715.

- WEISS, M., MANNEBERG, M., JURANVILLE, J.-F., LAHM, H.-W., FOUNTOULAKIS, M. (1998). Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A* 795, 263 - 275.
- WESTPHAL, Y., KÜHNEL, S., SCHOLS, H., VORAGEN, A., GRUPPEN, H. (2010a). LC/CE-MS tools for the analysis of complex arabino-oligosaccharides. *Carbohydrate Research* 345, 2239 - 2251.
- WESTPHAL, Y., KÜHNEL, S., WAARD, P. DE, HINZ, S., SCHOLS, H., VORAGEN, A., GRUPPEN, H. (2010b). Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. *Carbohydrate Research* 345, 1180 - 1189.
- WIKIERA, A., MIKA, M., GRABACKA, M. (2015). Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. *Food Hydrocolloids* 44, 156 - 161.
- WILLATS, W., KNOX, J., MIKKELSEN, J. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17, 97 - 104.
- WILLFOR, S., PRANOVICH, A., TAMMINEN, T., PULS, J., LAINE, C., SUURNAKKI, A., SAAKE, B., UOTILA, K., SIMOLIN, H., HEMMING, J., HOLMBOM, B. (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, 571 - 580.
- WILLIAMS, P., SAYERS, C., VIEBKE, C., SENAN, C., MAZOYER, J., BOULENGUER, P. (2005). Elucidation of the emulsification properties of sugar beet pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3592 - 3597.
- WILLIAMS, S., LEE, D. (2006). Field-flow fractionation of proteins, polysaccharides, synthetic polymers, and supramolecular assemblies. *Journal of Separation Science* 29, 1720 - 1732.
- WILLIS, R., MONTGOMERY, M., ALLEN, P. (1996). Improved method for manual, colorimetric determination of total Kjeldahl nitrogen using salicylate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1804 - 1807.
- WYATT, P. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta* 272, 1 - 40.
- XU, J., YUE, R., LIU, J., HO, H., YI, T., CHEN, H., HAN, Q. (2014). Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules* 67, 205 - 209.
- YAPO, B. (2011a). Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins - a new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers* 86, 373 - 385.
- YAPO, B. (2011b). Rhamnogalacturonan-I: a structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. *Polymer Reviews* 51, 391 - 413.
- YAPO, B., ROBERT, C., ETIENNE, I., WATHELET, B., PAQUOT, M. (2007a). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry* 100, 1356 - 1364.
- YAPO, B., WATHELET, B., PAQUOT, M. (2007b). Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties. *Food Hydrocolloids* 21, 245 - 255.

6 Literaturverzeichnis

- ZANDLEVEN, J., BELDMAN, G., BOSVELD, M., BENEN, J., VORAGEN, A. (2005). Mode of action of xylogalacturonan hydrolase towards xylogalacturonan and xylogalacturonan oligosaccharides. *Biochemical Journal* 387, 719 - 725.
- ZANDLEVEN, J., BELDMAN, G., BOSVELD, M., SCHOLS, H., VORAGEN, A. (2006). Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase. *Carbohydrate Polymers* 65, 495 - 503.
- ZHANG, L., SHI, Z., SHANGGUAN, W., FANG, Y., NISHINARI, K., PHILLIPS, G., JIANG, F. (2015). Emulsification properties of sugar beet pectin after modification with horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids* 43, 107 - 113.
- ZHENG, L., XU, Y., LI, Q., ZHU, B. (2021). Pectinolytic lyases: a comprehensive review of sources, category, property, structure, and catalytic mechanism of pectate lyases and pectin lyases. *Bioresources and Bioprocessing* 8, 79.
- ZHONG, R., YE, Z.-H. (2015). Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant & Cell Physiology* 56, 195 - 214.
- ZHOU, Y., MEI, Y., LUO, T., CHEN, W., ZHONG, Q., CHEN, H., CHEN, W. (2021). Study on the relationship between emulsion properties and interfacial rheology of sugar beet pectin modified by different enzymes. *Molecules* 26, 2829.
- ZIMM, B. (1948). The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics* 16, 1093 - 1099.
- ZYKWINSKA, A., GAILLARD, C., BULEON, A., PONTOIRE, B., GARNIER, C., THIBAUT, J., RALET, M. (2007). Assessment of *in vitro* binding of isolated pectic domains to cellulose by adsorption isotherms, electron microscopy, and X-ray diffraction methods. *Biomacromolecules* 8, 223 - 232.
- ZYKWINSKA, A., RALET, M., GARNIER, C., THIBAUT, J. (2005). Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology* 139, 397 - 407.
- ZYKWINSKA, A., THIBAUT, J., RALET, M. (2008). Modelling of xyloglucan, pectins and pectic side chains binding onto cellulose microfibrils. *Carbohydrate Polymers* 74, 23 - 30.

7 CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE

7.1 CHEMIKALIEN







Chemikalie	Hersteller, Reinheit	GHS- Symbole	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
6-Aminochinolyl- <i>N</i> - hydroxysuccinimidyl- carbammat	Santa Cruz Biotechnology	-	-	-
Alanin	Merck ≥98,5 %	-	-	-
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
Arginin Monohydrochlorid	Merck ≥99 %	07	319	305+351+338
Asparagin Monohydrat	Carl Roth, ≥99 %	-	-	-
Asparaginsäure	Carl Roth, ≥98,5 %	-	-	-
Citronensäure	Carl Roth, ≥99,5 %	07	319, 335	261, 280, 305+351+338
Cystein	Merck ≥99 %	-	-	-
Deuteriumoxid	Deutero, 99,9 %	-	-	-
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
Diethylether	Merck ≥99 %	02, 07	224, 302, 336	210, 233, 240, 241, 301+312, 403+233

7 Chemikalien und Instrumente

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 %	-	-	-
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, vergällt	VWR, 99 %	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233
Glutamin	Carl Roth, ≥99 %	-	-	-
Glutaminsäure	Carl Roth, ≥98,5 %	-	-	-
Glycin	Merck ≥99,7 %	-	-	-
Histidin	Merck ≥99 %	-	-	-
Hydroxyprolin	Merck ≥99 %	-	-	-
Isoleucin	Merck ≥98 %	-	-	-
Kjeldahl-Tabletten nach Wieninger	Fluka	-	412	273, 501
L-Arabinose	Sigma-Aldrich, ≥99 %	-	-	-
Leucin	Merck ≥98 %	-	-	-
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, ≥99,9 %	07	302, 315, 319	264, 270, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338
L-Rhamnose	Sigma-Aldrich, ≥99 %	-	-	-
Lysin	Sigma-Aldrich, ≥98 %	-	-	-
Methanol	Merck ≥99,5 %	02, 06, 08	225, 301+311+331, 370	210, 280, 301+310, 303+361+353, 304+340+311
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
Methionin	Merck ≥98 %	-	-	-

7.1 Chemikalien

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
Natriumhydroxid	Carl Roth, ≥99 %	05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Natriumnitrat	Merck ≥99,5	02, 07	272, 319	210, 305+351+338
Natriumtetraborat	VWR, ≥99 %	08	360FD	201, 280, 308+313
Natriumthiosulfat	Carl Roth, ≥99 %	-	-	-
3-(Trimethylsilyl)propion- 2,2,3,3-d4-säure	Sigma-Aldrich, ≥98 %D	-	-	-
Norleucin	Sigma-Aldrich ≥98 %	-	-	-
<i>ortho</i> -Cumarsäure	Merck ≥98 %	07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Phenylalanin	Merck ≥98 %	-	-	-
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	Merck ≥85 %	05, 07	290, 302, 314	234, 270, 280, 301+312, 303+361+353, 305+351+338
Prolin	Merck ≥99 %	-	-	-
Raffinose	Alfa Aesar, ≥99 %	-	-	-
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
Serin	Merck ≥99 %	-	-	-
Tetrahydrofuran	Sigma Aldrich, ≥99 %	02, 07, 08	225, 302, 319, 335, 351	210, 280, 301+312+330, 305+351+338, 370+378, 403+235
Threonin	Merck ≥99 %	-	-	-
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, ≥99 %	05, 07	314, 332, 412	261, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338

Tyrosin	Merck ≥99 %	07	315, 319, 335	261, 305+351+338	
Valin	ThermoFisher Scientific ≥95 %	-	-	-	
GHS02	GHS05	GHS06	GHS07	GHS08	GHS09
					
Entzündlich	Ätzend	Giftig	Gesundheits- schädlich	Systemische Gesundheits- gefährdung	Umwelt- gefährlich

7.2 ENZYMPRÄPARATE

Tabelle 20: Herstellerinformationen zu den verwendeten Enzympräparaten

Enzym	EC Nr.	Ursprungs- organismus	rekombinante Expression	spezifische Aktivität	Bezugsquelle
Amyloglucosidase	3.2.1.3	<i>Aspergillus niger</i>	Nein	36 U/mg	Megazyme
<i>endo</i> - α -1,5-L-Arabinanase	3.2.1.99	<i>Aspergillus niger</i>	Nein	10 U/mg	Megazyme
α -L-Arabinofuranosidase	3.2.1.55	<i>Aspergillus niger</i>	Nein	32 U/mg	Megazyme
Cellulase (Celluclast®)	232.734.4	<i>Trichoderma reesei</i>	Nein	0,7 U/mg	Sigma-Aldrich
Ferulasäure-esterase	3.1.1.73	Pansen Mikroorganismen	Ja	30 U/mg	Megazyme
<i>endo</i> - β -1,4-D-Galactanase	3.2.1.89	<i>Aspergillus niger</i>	Nein	150 U/mg	Megazyme
<i>endo</i> -Polygalacturonase M2	3.2.1.15	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Nein	150 U/mg	Megazyme
Protease (Subtilisin A)	3.4.21.62	<i>Bacillus licheniformis</i>	Nein	6 U/mg	Megazyme
Pektin Lyase	4.2.2.10	<i>Trichoderma reesei</i>	Ja	~2 U/mg	Erbslöh
<i>endo</i> - α -1,4-D-Polygalacturonase	3.2.1.15	<i>Trichoderma reesei</i>	Ja	~3 U/mg	Erbslöh

7.3 PUFFER UND LÖSUNGEN

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

- Natriumhydroxidlösung (0,5 %)
 - 0,1 g Natriumhydroxid
 - 20 mL Reinstwasser
- 3-Phenylphenollösung (0,15 %)
 - 30 mg 3-Phenylphenol
 - 20 mL Natriumhydroxidlösung (0,5 %)

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

- 7,46 mL Ammoniak (25 %)
- 50 mL Reinstwasser

AQC-Lösung für die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Proteine

- 1 mg AQC
- 333 µL Acetonitril

Boratpuffer für die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Proteine

- 2,4 g Natriumtetraborat
- 100 mL Wasser
- mit 1 M Natronlauge pH 8,8 einstellen

Citronensäurelösungen zur Pektinextraktion

- 10 mM: 1,92 g Citronensäure/L Reinstwasser
- 50 mM: 9,6 g Citronensäure/L Reinstwasser
- 100 mM: 19,2 g Citronensäure/L Reinstwasser

Natriumnitratlösung (50 mM) für die Analyse mittels HPSEC

- 4,25 g Natriumnitrat
- 1 L Reinstwasser

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

- 3,95 g Natriumthiosulfat
- 250 mL Reinstwasser

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

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

TMSP- d_4 -Lösung für die Quantifizierung von freigesetztem Methanol und freigesetzter Essigsäure

- 25 mg 3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3- d_4 -säure Natriumsalz
- 50 mL D_2O

TFA-Lösung (2 M) für die Hydrolyse zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

- 84,6 mL Reinstwasser
- 15,4 mL Trifluoressigsäure

7.4 INSTRUMENTE**7.4.1 CHROMATOGRAPHISCHE SÄULEN**

LC-Säule	Partikelgröße / μm	Porengröße / nm	Maße (L x ID) / mm	Hersteller
CarboPac PA20	6	< 0,1	150 x 3,0	Dionex, ThermoFisher Scientific
CarboPac PA200	6	< 1	250 x 3,0	Dionex, ThermoFisher Scientific
Luna C18(2)	5	10	250 x 4,6	Phenomenex
Luna Phenyl-Hexyl	5	10	250 x 4,6	Phenomenex
TSKgel G4000 PW _{XL}	10	50	300 x 7,8	Tosoh Bioscience
TSKgel G5000 PW _{XL}	10	100	300 x 7,8	Tosoh Bioscience
TSKgel G6000 PW _{XL}	13	> 100	300 x 7,8	Tosoh Bioscience

GC-Säule	Filmdicke / μm	Maße (L x ID) / mm	Hersteller
DB-225/DB-225 (MS)	0,25	30000 x 0,25	Agilent Technologies

7.4.2 ANALYSENGERÄTE

HPAEC-PAD

Hersteller	Dionex, ThermoFisher Scientific
Pumpe	ICS-5000 DP
Autosampler	AS-AP
Detektorkompartiment	ICS-5000 DC
Detektor (PAD)	ICS-5000 ED

HPAEC-PAD/MS

Hersteller	Dionex, ThermoFisher Scientific
Pumpe (Eluent)	ICS-6000 SP
Autosampler	AS-AP
Detektorkompartiment	ICS-6000 DC
Detektor (PAD)	ICS-6000 ED
Suppressor	AERS 500e (4 mm)
Detektor (CD)	ICS-6000 CD
Pumpe (Regenerent)	AXP-Pump
Pumpe (LiCl)	AXP-MS-Pump
Detektor (MS)	ISQ IC Mass Spectrometer

HPSEC-RI/DAD/MALS

Hersteller	Hitachi, Merck
Pumpe	L-7100
Autosampler	L-7200
Interface	D-7000
Detektor (RI)	L-7490
Detektor (DAD)	L-7450
Detektor (MALS)	SLD7100 (PSS Polymer Solutions)

HPLC-DAD

Hersteller	Shimadzu
Pumpe	3x LC-20AT
Autosampler	SIL-20AC
Detektor (DAD)	SPD-M20A
Detektor (FLD)	RF-10A _{XL}

7 Chemikalien und Instrumente

GC-FID

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

GC-MS

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

NMR-Spektrometer

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

UV/Vis-Photometer

Hersteller	Jasco
Bezeichnung	V-550 UV/Vis-Spectrophotometer

8 ARBEITSVORSCHRIFTEN

8.1 PEKTINEXTRAKTION

8.1.1 SÄUREEXTRAKTION

Tag 1:

- 15 - 25 g Probenmaterial in 500 mL Erlenmeyerkolben mit **VE-Wasser bzw. Citronensäurelösung (10 - 100 mM)** versetzen (**10 - 30 mL/g**)
- 1 h im Schüttelinkubator (50 °C) vorquellen
- 10 min auf Eis, 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- mit 4 M Salpetersäure bzw. 1 M Natronlauge **pH 2 - 6** einstellen
- **1 - 16 h** im Wasserbad bei 80 °C inkubieren
- 35 min auf Eis, 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Suspension möglichst quantitativ in Zentrifugenbecher überführen, mit 100 mL Wasser nachspülen, Feststoff abzentrifugieren
- Überstand über feinmaschiges Gewebetuch in geeignetes Gefäß überführen (minimales Gefäßvolumen: vierfaches Extraktvolumen). Rückstand händisch auspressen. Zum Nachspülen 50 mL Wasser verwenden
- **2,2-faches** Extraktvolumen an IPA zugeben, über Nacht präzipitieren

Tag 2:

- Überstand über Gewebetuch abgießen, mit 100 mL **70 %igen IPA** nachspülen
- Präzipitat ausdrücken, mit Tuch in große Kristallisierschale auslegen und zerkleinern
- 200 mL **70 %iges IPA** zugeben, mit Präzipitat vermengen und auspressen
- 200 mL reines IPA zugeben, mit Präzipitat vermengen und auspressen
- Präzipitat zerkleinert und möglichst einlagig in geeignete Kristallisierschale überführen und abgedeckt über Nacht im Abzug abdampfen lassen.

Tag 3:

- im Trockenschrank bei Umluft und 50 °C für 1 h trocknen
- mahlen der Proben (Partikeldurchmesser < 0,5 mm)
- Lagerung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss

8.1.2 ENZYMATISCH UNTERSTÜTZTE EXTRAKTION

Tag 1:

- 15 g Probenmaterial in 500 mL Erlenmeyerkolben mit 250 mL VE-Wasser versetzen
- 1 h im Schüttelinkubator (50 °C) vorquellen
- 10 min auf Eis, 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- mit 4 M Salpetersäure **pH 2** einstellen
- **1 h** im Wasserbad bei 80 °C inkubieren
- 35 min auf Eis, 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- mit 2 M Natronlauge **pH 5,5** einstellen
- **0, 11 bzw. 33 U Cellulase/g** Pektin zugeben
- 2 h im Schüttelinkubator (50 °C) inkubieren
- Enzyme inaktivieren (95 °C, 5 min)
- 15 min auf Eis, 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Suspension möglichst quantitativ in Zentrifugenbecher überführen, mit 100 mL Wasser nachspülen, Feststoff abzentrifugieren
- Überstand über feinmaschiges Gewebetuch in geeignetes Gefäß überführen (minimales Gefäßvolumen: vierfaches Extraktvolumen). Rückstand händisch auspressen. Zum Nachspülen 50 mL Wasser verwenden
- **2,2-faches** Extraktvolumen an IPA zugeben, über Nacht präzipitieren

Tag 2 und Tag 3:

- siehe Abschnitt 8.1.1

8.1.3 AUTOKLAVENEXTRAKTION

Tag 1:

- 20 g Probenmaterial in 500 mL Schottflasche mit 200 mL VE-Wasser versetzen
- 1 h im Schüttelinkubator (50 °C) vorquellen
- 10 min auf Eis, 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- ggf. mit 4 M Salpetersäure **pH 2,5 bzw. 3,5** einstellen
- **20 - 60 min** im Autoklav bei 121 °C inkubieren
- 35 min auf Eis, 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Suspension möglichst quantitativ in Zentrifugenbecher überführen, mit 100 mL Wasser nachspülen, Feststoff abzentrifugieren
- Überstand über feinmaschiges Gewebetuch in geeignetes Gefäß überführen (minimales Gefäßvolumen: vierfaches Extraktvolumen). Rückstand händisch auspressen. Zum Nachspülen 50 mL Wasser verwenden
- **2,2-faches** Extraktvolumen an IPA zugeben, über Nacht präzipitieren

Tag 2 und Tag 3:

- siehe Abschnitt 8.1.1

8.2 STRUKTURCHARAKTERISIERUNG DER EXTRAHIERTEN PEKTINE

8.2.1 MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG

- Probenmaterial in 50 mM Natriumnitratlösung lösen (2 mg/mL)
- 2 h im Eppischüttler lösen (50 °C)
- zentrifugieren, Überstand in 1,5 mL Vial überführen
- Probe mittels HPSEC-RI/MALS analysieren

Analyse mittels HPSEC-RI/MALS

Säule:	TSKgel PW _{XL} 6000 (300 mm x 7,8 mm)
Eluent:	50 mM Natriumnitratlösung (isokratisch)
Fluss:	0,5 mL/min
Injektionsvolumen:	50 µL
Säulentemperatur:	50 °C
Detektion:	RI/MALS ($dn/dc = 0,135 \text{ mL/g}$)

8.2.2 CHARAKTERISIERUNG DER PROTEINFRAKTION

8.2.2.1 BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS

- 100 mg Probenmaterial in Kjeldahl-Kolben mit Glasperlen einwiegen
- 500 mg Selenreaktionsgemisch (Kjeldahl-Katalysator) und 5 mL konzentrierte Schwefelsäure zugeben
- 1,5 - 2 h (bis zur Auflösung des Probenrückstands) auf einem Heizblock erhitzen
- abkühlen lassen, 10 mL Wasser zugeben
- Probe in 50 mL Messkolben überführen, bis zur Markierung mit Wasser auffüllen
- Kalibrierlösungen herstellen
 - NH₄Cl-Stammlösung mit 1 g N/L (382 mg Ammoniumchlorid | 100 mL Wasser)
 - Kalibrierlösungen mit 0,1 mg N/L / 1 mg N/L / 10 mg N/L: 20 µL / 200 µL / 2000 µL der NH₄Cl-Stammlösung + 4 mL konzentrierte Schwefelsäure | 200 mL Wasser
- 50 mL der Kalibrierlösungen bzw. 1 mL der Aufschlusslösung der Probe zusammen mit 49 mL Wasser in ein Becherglas überführen
- 3 mL 2 M Natronlauge zugeben und Stickstoffgehalt mittels ammoniaksensitiver Elektrode bestimmen
- Stickstoffgehalt mittels Umrechnungsfaktor 6,25 in Proteingehalt umrechnen

8.2.2.2 AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG

Hydrolyse

- 50 mg Probenmaterial in 8 mL Vial einwiegen, 2,5 mL halbkonzentrierte Salzsäure zugeben, Gasraum mit Stickstoff spülen
- bei 120 °C über 20 h im Trockenschrank hydrolysieren
- abkühlen lassen, zentrifugieren (2500 g; 4 min)
- Überstand durch Spritzenfilter (0,45 µm; PTFE) filtrieren

Derivatisierung

- Proben 1 zu 10 verdünnen
- 20 µL der verdünnten Probe bzw. 20 µL der Kalibrierlösungen mit 20 µL der internen Standardsubstanz (0,1 mM Norleucinlösung) versetzen
- 180 µL Boratpuffer (pH = 8,8) und 50 µL der AQC-Lösung hinzugeben
- 10 min bei 55 °C inkubieren
- Proben mittels HPLC-FLD analysieren

Analyse mittels HPLC-FLD

Säule:	Luna C18(2) (250 x 4,6 mm)
Fluss:	1,0 mL/min
Injektionsvolumen:	10 µL
Säulentemperatur:	35 °C
Detektion:	FLD (Anregung bei $\lambda=250$ nm, Detektion bei $\lambda=395$ nm)
Kalibrierung:	5 Punkt-Kalibrierung der relevanten Aminosäuren (Hydroxyprolin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glycin, Histidin, Arginin, Threonin, Alanin, Prolin, Cystein, Tyrosin, Valin, Methionin, Lysin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin) mit Konzentrationen von 0,0025; 0,05; 0,1; 0,15 und 0,2 mM

Tabelle 21: Gradientenprogramm der HPLC-FLD Analyse zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Proteinfraktion der Pektine. Eluent A: Natriumacetatpuffer (60 mM; pH 5,1), Eluent B: Acetonitril, Eluent C: Reinstwasser

Zeit / min	Eluent A / %	Eluent B / %	Eluent C / %
0,0	94,0	6,0	0,0
30,0	87,0	13,0	0,0
30,5	80,0	20,0	0,0
38,0	76,0	24,0	0,0
48,0	73,7	26,3	0,0
55,0	0,0	50,0	50,0
55,5	94,0	6,0	0,0
65,0	94,0	6,0	0,0

8.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER POLYSACCHARIDFRAKTION

8.2.3.1 MONOSACCHARIDZUSAMMENSETZUNG

- 6 - 8 mg Probenmaterial in 4 mL Vial einwiegen
- 500 μ L 1,25 M methanolische Salzsäure zugeben
- 16 h bei 80 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- abkühlen lassen, 10 μ L des Überstands in 1,5 mL Vial überführen, bis zur Trockene eindampfen
- Zugabe von 125 μ L 2 M TFA und Hydrolyse über 1 h bei 121 °C im Trockenschrank
- bis zur Trockene eindampfen, 200 μ L Ethanol zugeben und erneut bis zur Trockene eindampfen (2x)
- Probe in 1 mL Wasser aufnehmen, entsprechend verdünnen und mittels HPAEC-PAD analysieren

Analyse mittels HPAEC-PAD

Säule:	CarboPac PA20 (150 mm x 3 mm)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 μ L
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion (PAD):	AgCl-Elektrode (20 °C)
Kalibrierung:	2 Fünfpunktkalibrierungen (1 - 25 μ M und 25 - 125 μ M) der 10 Monosaccharide: Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xylose, Mannose, Fructose, Galacturonsäure, Glucuronsäure

Tabelle 22: Gradientenprogramm der HPAEC-PAD Analyse zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetatlösung

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

8.2.3.2 ANALYSE DER GLYKOSIDISCHEN BINDUNGEN MITTELS METHYLIERUNGSANALYSE

Methylierung (zweifache Durchführung)

- 5 mg gut getrocknetes und homogenes Probenmaterial in 15 mL Pyrexglas einwiegen
- 2 mL Dimethylsulfoxid zugeben und 15 min im Ultraschallbad behandeln
- über Nacht quellen lassen und anschließend erneut 15 min im Ultraschallbad behandeln
- 100 mg frisch unter Stickstoff gemörstertes Natriumhydroxid zugeben
- 90 min im Ultraschallbad behandeln, 90 min bei Raumtemperatur reagieren lassen
- 1 mL Methyliodid zugeben
- 30 min im Ultraschallbad behandeln, 30 min bei Raumtemperatur reagieren lassen
- 3 mL Dichlormethan und 5 mL 0,1 M Natriumthiosulfatlösung zugeben und gut durchmischen
- wässrige Phase abnehmen und organische Phase zweifach mit Wasser waschen
- Lösungsmittel abrotieren, mögliche Lösungsmittelreste unter Stickstoffstrom entfernen
- Proben über Nacht bei 40 °C im Trockenschrank trocknen

Hydrolyse, Reduktion und Derivatisierung

- 2 mL TFA zugeben und über 90 min bei 121 °C im Trockenschrank behandeln
- Lösungsmittel abrotieren, mögliche Lösungsmittelreste unter Stickstoffstrom entfernen
- 20 mg Natriumborodeuterid in 0,3 mL Ammoniak zugeben, 60 min bei Raumtemperatur reagieren lassen
- Reaktion durch die Zugabe von 100 µL Eisessig abbrechen
- unter Eiskühlung 450 µL 1-Methylimidazol und 3 mL Essigsäureanhydrid zugeben
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- unter Eiskühlung 3 mL Wasser zugeben, mit 5 mL Dichlormethan extrahieren
- organische Phase dreimal mit 3 mL Wasser waschen
- Restwasser über Nacht bei -18 °C ausfrieren
- organische Phase in 4 mL Vial überführen und mittels GC-MS/GC-FID analysieren

Analyse mittels GC-MS und GC-FID

Säule:	DB-225 (MS) (30 m x 0,25 µm)
Injektionsvolumen:	5 µL
Injektionstemperatur:	220 °C
Injektionsart:	Split (10:1)
Trägergas:	Helium
Trägergasgeschwindigkeit:	40 cm/s
Detektion (MS):	Elektronenstoßionisation mit 70 eV Transferline-Temperatur: 220 °C
Detektion (FID):	Temperatur 240 °C
Temperaturprogramm:	Anfangstemperatur 140 °C (1 min halten) Aufheizphase (4 min) mit 20 °C/min bis 220 °C, halten für 25 min

8.2.3.3 ENZYMATISCHES ARABINANPROFILING

Enzymatische Hydrolyse

- Pektinlösung herstellen (1 mg/mL)
- 2 μL einer 20 U/mL *endo*- α -1,5-L-Arabinanase-Lösung zu 200 μL der Pektinlösung geben (200 U/g), vorsichtig vermischen
- 24 h bei 40 °C im Eppischüttler inkubieren lassen
- Enzyme inaktivieren (95 °C, 5 min)
- 15 μL Überstand und 15 μL 100 μM Raffinoselösung zu 120 μL Wasser geben
- Proben mittels HPAEC-PAD/MS analysieren

Analyse mittels HPAEC-PAD/MS

Säule:	CarboPac PA200 (250 mm x 3 mm)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 μL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion (PAD):	AgCl-Elektrode (20 °C)
Detektion (MS):	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 im positiven Modus (Lithium-Addukte)

Tabelle 23: Gradientenprogramm der HPAEC-PAD/MS Analyse zur Bestimmung der durch *endo*- α -1,5-L-Arabinanase freigesetzten Arabinan oligosaccharide. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetatlösung

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

8.2.4 ANALYSE HYDROPHOBER SUBSTITUENTEN

8.2.4.1 BESTIMMUNG DES FERULASÄUREGHALTS

- 50 mg Probenmaterial in 15 mL Pyrexglas einwiegen und Rührfisch zugeben
- 2 M Natronlauge mit Stickstoff begasen, 5 mL zugeben, Gasraum mit Stickstoff fluten, verschließen
- 18 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und Rühren verseifen lassen
- Suspension mit konzentrierter Salzsäure auf pH < 2 ansäuern
- 150 µL einer 1 mg/mL *ortho*-Cumarsäurelösung zugeben (interne Standardsubstanz)
- 20 min bei Raumtemperatur equilibrieren
- Phenolische Säuren mit 3 mL Diethylether extrahieren (3x)
- vereinigte organische Phase unter Stickstoffstrom trocknen
- Rückstand in 500 µL Methanol/Wasser (50:50, v:v) aufnehmen
- Probe 1 zu 10 verdünnen und mittels HPLC-DAD analysieren

Analyse mittels HPLC-FD

Säule:	Luna Phenyl-Hexyl (250 x 4,6 mm)
Fluss:	1 mL/min
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulentemperatur:	45 °C
Detektion:	DAD ($\lambda=323$ nm)

Tabelle 24: Gradientenprogramm der HPLC-DAD Analyse zur Quantifizierung von *trans*-Ferulasäure in den Pektinextrakten. Eluent A: 1 mM TFA, Eluent B: Methanol/1 mM TFA (90/10, v/v), Eluent C: Acetonitril/1 mM TFA (90/10, v/v)

Zeit / min	Eluent A / %	Eluent B / %	Eluent C / %
0,0	87,0	0,0	13,0
10,0	87,0	0,0	13,0
20,0	77,0	3,0	20,0
25,0	70,0	5,0	25,0
30,0	25,0	25,0	50,0
35,0	0,0	50,0	50,0
40,0	0,0	50,0	50,0
45,0	87,0	0,0	13,0
50,0	87,0	0,0	13,0

8.2.4.2 BESTIMMUNG DES ACETYLIERUNGS- UND METHYLIERUNGSGRADS

BESTIMMUNG DES URONSÄUREGEGHALTS

Vorhydrolyse

- 12 - 14 mg Probenmaterial in 3,5 mL Vial mit Glasperlen einwiegen
- auf Eis 400 µL 12 M Schwefelsäure zugeben, vortexen
- 30 min auf Eis stehen lassen, alle 10 min vortexen
- 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen und alle 30 min vortexen
- 2,6 mL Wasser zugeben
- Überstand durch Spritzenfilter (PTFE; 0,45 µm) filtrieren, Filtrat verdünnen (1 zu 40 - 80)

Photometrische Bestimmung

- je 400 µL der verdünnten Probe in vier (3x Probe, 1x Blindwert) 15 mL Pyrexgläser geben
- unter Eiskühlung 2,4 mL schwefelsaure Natriumtetraboratlösung (12,5 mM in konzentrierter Schwefelsäure) zugeben und umgehend vortexen
- 5 min bei 95 °C im Wasserbad inkubieren, umgehend auf Eis abkühlen lassen
- je 40 µL 3-Phenylphenollösung (0,15 % in 0,5 %iger Natronlauge) zu Proben bzw. 40 µL 0,5 %ige Natronlauge zu Blindwert geben, umgehend vortexen
- in Küvetten umfüllen, nach 20 min am Spektrophotometer Extinktion bei 520 nm messen

Kalibrierung

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

BESTIMMUNG DES METHANOL- UND ESSIGSÄUREGEGHALTS NACH VERSEIFUNG

Verseifung

- 15 mg Probenmaterial in 3,5 mL Vial einwiegen
- 1,5 mL 2 M Natronlauge in D₂O und 150 µL TMSP-*d*₄ (0,5 mg/mL in D₂O) zugeben
- 2 h im Ultraschallbad behandeln
- Überstand durch Spritzenfilter (PTFE; 0,45 µm) filtrieren
- 550 µL in NMR-Röhrchen überführen

NMR-Messung

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

8.3 GEZIELTE MODIFIKATION DER PEKTINSTRUKTUR

8.3.1 MODIFIKATION DES VERESTERUNGSGRADS DURCH ALKALIBEHANDLUNG

Tag 1:

- 2 x 1,65 g SBP in 1 L Bechergläser einwiegen, Rührfisch dazu
- jeweils 250 mL gekühlte (4 °C) 20 mM Natronlauge hinzugeben (~3 mmol NaOH/g SBP)
- **15 min** bzw. **180 min** bei 4 °C rühren (Eisbad auf Magnetrührer)
- mit 2 M Salzsäure pH 4 einstellen
- 2,2-faches Volumen an IPA zugeben, über Nacht präzipitieren

Tag 2 und Tag 3:

- siehe Abschnitt 8.1.1

8.3.2 ENZYMATISCHE MODIFIKATION VERSCHIEDENER STRUKTURELEMENTE

Tag 1:

- 6 x 4 g SBP in 1 L Erlenmeyerkolben einwiegen, Rührfisch dazu
- 200 mL VE-Wasser hinzugeben und 1 h in Schüttelinkubator (40 °C) vorquellen
- mit 1 M Natronlauge pH 6 einstellen
- Enzymzugabe:
 - KP: Keine Enzymzugabe
 - AA: *endo*- α -1,5-L-Arabinanase (5 U/g SBP)
 - GA: *endo*- β -1,4-D-Galactanase (10 U/g SBP)
 - PROT: Subtilisin A Protease (18 U/g SBP)
 - FAE: Ferulasäureesterase (0,05 U/g SBP)
- 24 h im Schüttelinkubator (40 °C) inkubieren
 - nach 23 h Inkubation Zugabe *endo*- β -1,4-D-Polygalacturonase (5 U/g SBP)
- Enzyme inaktivieren (95 °C; 5 min), 30 min auf Eis abkühlen
- 2,2-faches Volumen an IPA zugeben, über Nacht präzipitieren

Tag 2 und Tag 3:

- siehe Abschnitt 8.1.1

8.3.3 ENZYMATISCHE MODIFIKATION DER ARABINANFRAKTION

Tag 1:

- 3 x 3 g SBP in 500 mL Erlenmeyerkolben einwiegen, Rührfisch dazu
- 150 mL VE-Wasser hinzugeben und 1 h in Schüttelinkubator (40 °C) vorquellen
- mit 0,5 M Natronlauge pH 4 einstellen
- Enzymzugabe:
 - KP: keine Enzymzugabe
 - AA10: *endo*-1,5- α -L-Arabinanase (10 U/g SBP)
 - AA40: *endo*-1,5- α -L-Arabinanase (40 U/g SBP)
 - AF10: α -L-Arabinofuranosidase (10 U/g SBP)
 - AF40: α -L-Arabinofuranosidase (40 U/g SBP)
- 24 h im Schüttelinkubator (40 °C) inkubieren
- Enzyme inaktivieren (95 °C; 5 min), 30 min auf Eis abkühlen
- 2,2-faches Volumen an IPA zugeben, über Nacht präzipitieren

Tag 2 und Tag 3:

- siehe Abschnitt 8.1.1

8.3.4 ENZYMATISCHE MODIFIKATION DER GALACTURONANFRAKTION

Tag 1:

- 4 x 3 g SBP in 500 mL Erlenmeyerkolben einwiegen, Rührfisch dazu
- 150 mL VE-Wasser hinzugeben und 1 h in Schüttelinkubator (40 °C) vorquellen
- mit 0,5 M Natronlauge pH 3,5 einstellen
- Enzymzugabe:
 - 9 U PGA und 15 U PLY/g SBP
 - KP: keine Enzymzugabe
- **20 min** bzw. **60 min** bzw. **180 min** im Schüttelinkubator (40 °C) inkubieren
 - KP: 180 min
- Enzyme inaktivieren (95 °C; 5 min), 30 min auf Eis abkühlen
- 2,2-faches Volumen an IPA zugeben, über Nacht präzipitieren

Tag 2 und Tag 3:

- siehe Abschnitt 8.1.1

8.4 ENZYMATISCHER STÄRKEABBAU DES TRAUBENPEKTINS

Tag 1:

- 2 x 2 g Traubenpektin in 1 L Erlenmeyerkolben einwiegen, Rührfisch dazu
- 200 mL VE-Wasser hinzugeben und 1 h in Schüttelinkubator (40 °C) vorquellen
- pH-Wert überprüfen (pH = 4,3)
- Enzymzugabe:
 - M_A KP: keine Enzymzugabe
 - M_A AMG: 75 U Amyloglucosidase/g Traubenpektin
- 16 h im Schüttelinkubator (40 °C) inkubieren
- Enzyme inaktivieren (95 °C; 5 min), 30 min auf Eis abkühlen
- 2,2-faches Volumen an IPA zugeben, über Nacht präzipitieren

Tag 2 und Tag 3:

- siehe Abschnitt 8.1.1

9 ANHANG

9.1 TABELLEN

Tabelle 25: Pektinausbeuten (n = 2), Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und x_{90,3}-Werte (n = 3) der bei pH-Werten von 2 bzw. 3 und variierenden Extraktionszeiten (t = 1, 2, 4 und 16 h) gewonnenen Pektine (± Range/2 bzw. Standardabweichung). DAC: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, M_w: Molekulargewicht (Gewichtsmittel), t-FA: *trans*-Ferulasäuregehalt, x_{90,3}: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	pH 2 / 80 °C				pH 3 / 80 °C			
	1 h	2 h	4 h	16 h	1 h	2 h	4 h	16 h
Ausbeute	15,6	18,3	20,1	22,2	3,0	5,9	8,3	14,1
/ %	± 0,4	± 0,3	± 0,2	± 0,2	± 0,2	± 0,1	± 1,6	± 1,0
x_{90,3}	0,81	0,97	1,03	1,09	1,23	0,70	0,84	0,86
/ μm	± 0,01	± 0,01	± 0,02	± 0,01	± 0,06	± 0,01	± 0,01	± 0,01
M_w	913	824	695	285	154	196	388	505
/ kDa	± 19	± 62	± 51	± 20	± 13	± 38	± 30	± 17
Proteingehalt	6,0	6,6	6,6	6,8	4,0	3,5	3,6	4,6
/ %	± 0,1	± 0,2	± 0,1	± 0,2	± 0,1	± 0,1	± 0,1	± 0,1
DM	70,6	62,1	59,8	56,4	73,7	62,7	61,6	58,5
/ %	± 2,6	± 0,6	± 2,3	± 2,5	± 0,2	± 2,5	± 0,5	± 2,4
DAC	46,2	38,4	33,5	16,0	45,3	38,1	42,1	38,0
/ %	± 1,7	± 0,2	± 1,6	± 0,8	± 0,1	± 0,9	± 1,1	± 1,9
t-FA	676	682	668	567	523	509	679	750
/ mg/100 g	± 10	± 16	± 47	± 7	± 4	± 7	± 17	± 15

Tabelle 26: Pektinausbeuten (n = 2), Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und x_{90,3}-Werte (n = 3) der nach 16-stündiger Extraktion bei pH-Werten von 2, 3 bzw. 4 gewonnenen Pektine (± Range/2 bzw. Standardabweichung). Die Extraktionen erfolgten bei 80 °C unter Zusatz von 100 mM Citronensäure. DAc: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, *t*-FA: *trans*-Ferulasäuregehalt M_w: Molekulargewicht (Gewichtsmittel), x_{90,3}: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	16 h / 80 °C		
	pH 2	pH 3	pH 4
Ausbeute / %	24,3 ± 0,2	21,9 ± 0,4	17,6 ± 1,0
x_{90,3} / μm	1,16 ± 0,03	0,89 ± 0,02	0,76 ± 0,01
M_w / kDa	154 ± 19	223 ± 8	419 ± 12
Proteingehalt / %	6,7 ± 0,1	5,0 ± 0,1	3,7 ± 0,1
DM / %	54,8 ± 0,2	65,0 ± 2,7	59,6 ± 2,1
DAc / %	20,7 ± 0,1	40,5 ± 1,9	38,8 ± 1,5
<i>t</i>-FA / mg/100g	635 ± 1	661 ± 5	691 ± 5

Tabelle 27: Pektinausbeuten (n = 2), Strukturparameter (n = 2 bzw. n = 3 für M_w) und x_{90,3}-Werte (n = 3) der Pektine nach Autoklavenextraktion (121 °C) bei pH 4,6 über variierende Zeiten (t = 20, 40 und 60 min) sowie bei pH 2,5 bzw. 3,5 und einer Extraktionszeit von 20 min (± Range/2 bzw. Standardabweichung). DAc: Acetylierungsgrad, DM: Methylierungsgrad, *t*-FA: *trans*-Ferulasäuregehalt, M_w: Molekulargewicht (Gewichtsmittel), x_{90,3}: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

pH-Wert	Autoklavenextraktionen				
	2,5	3,5	4,6	4,6	4,6
Extraktionszeit / min	20	20	20	40	60
Ausbeute / %	16,7	18,9	16,8	18,9	16,7
x_{90,3} / μm	1,04 ± 0,02	0,76 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,96 ± 0,03	13,6 ± 2,2
M_w / kDa	165 ± 3	272 ± 14	272 ± 22	196 ± 20	103 ± 9
Proteingehalt / %	8,8 ± 0,1	4,2 ± 0,1	2,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1
DM / %	60,1 ± 0,4	66,3 ± 0,5	67,9 ± 2,2	74,2 ± 3,4	77,0 ± 1,9
DAc / %	40,5 ± 0,2	46,5 ± 0,2	43,4 ± 0,5	50,7 ± 1,8	56,4 ± 1,0
<i>t</i>-FA / mg/100 g	659 ± 33	721 ± 18	808 ± 21	663 ± 5	653 ± 28

Tabelle 28: Anteile der glykosidischen Bindungen (mol% \pm Range/2) der stufenweise mit Isopropanol gefällten Zuckerrübenpektine, bestimmt mittels Methylierungsanalyse. Die Pektine wurden durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Ara: Arabinose, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, n.q.: nicht quantifiziert, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, t: terminal, Xyl: Xylose

Glykosidische Bindungstypen	Isopropanolanteil			
	20 %	20 - 40 %	40 - 70 %	
Arabinose	t-Araf	19,6 \pm 0,2	29,7 \pm 0,1	28,8 \pm 0,3
	t-Arap	0,3 \pm 0,1	3,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1
	1,2-Araf	0,6 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
	1,3-Araf	1,2 \pm 0,1	4,7 \pm 0,4	1,8 \pm 0,1
	1,5-Araf	17,3 \pm 0,1	22,9 \pm 0,7	21,1 \pm 0,3
	1,3,5-Araf	13,2 \pm 0,2	12,0 \pm 0,5	16,3 \pm 0,3
	1,2,5-Araf	1,1 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
	1,2,3,5-Araf	1,9 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1
Galactose	t-Galp	1,6 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	3,6 \pm 0,3
	1,3-Galp	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
	1,4-Galp	1,6 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	5,3 \pm 0,1
	1,6-Galp	1,2 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1
	1,2,4-Galp	n.q.	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
	1,3,4-Galp	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
	1,3,6-Galp	1,7 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2
Rhamnose	1,2-Rhap	0,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	2,7 \pm 0,3
	1,2,4-Rhap	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	3,1 \pm 0,4
Glucose	t-Glcp	0,7 \pm 0,1	3,8 \pm 0,3	0,3 \pm 0,1
	1,4-Glcp	1,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	n.q.
	1,4,6-Glcp	29,7 \pm 0,7	7,5 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1
Xylose	t-Xylp	1,3 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
	1,2-Xylp	1,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
	1,4-Xylp	0,4 \pm 0,1	n.q.	n.q.

Tabelle 29: Anteile der glykosidischen Bindungen (mol% \pm Range/2) der bei pH 2 und 80 °C für 1, 2, 4 bzw. 16 h extrahierten Zuckerrübenpektine, bestimmt mittels Methylierungsanalyse.
 Ara: Arabinose, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, t: terminal, Xyl: Xylose

Glykosidische Bindungstypen	pH 2				
	1 h	2 h	4 h	16 h	
Arabinose	t-Araf	30,3 \pm 0,5	24,5 \pm 0,3	18,5 \pm 0,1	5,9 \pm 0,1
	t-Arap	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3
	1,2-Araf	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
	1,3-Araf	1,7 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1
	1,5-Araf	22,6 \pm 0,1	17,5 \pm 0,7	14,4 \pm 0,8	5,2 \pm 0,7
	1,3,5-Araf	16,4 \pm 0,1	10,5 \pm 0,2	6,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
	1,2,5-Araf	1,8 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
	1,2,3,5-Araf	3,8 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	3,3 \pm 0,9	0,1 \pm 0,1
Galactose	t-Galp	3,4 \pm 0,1	6,5 \pm 0,2	7,8 \pm 0,1	16,8 \pm 1,1
	1,3-Galp	1,5 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
	1,4-Galp	4,1 \pm 0,3	7,3 \pm 0,1	9,2 \pm 0,1	15,2 \pm 0,1
	1,6-Galp	2,4 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1	5,4 \pm 0,3	13,3 \pm 0,1
	1,2,4-Galp	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1
	1,3,4-Galp	0,3 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
	1,3,6-Galp	2,0 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	2,9 \pm 0,2
Rhamnose	1,2-Rhap	1,9 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1	12,8 \pm 0,4
	1,2,4-Rhap	2,1 \pm 0,3	3,6 \pm 0,1	4,2 \pm 0,5	8,3 \pm 0,3
Glucose	t-Glcp	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
	1,4-Glcp	2,4 \pm 0,1	5,2 \pm 0,4	8,8 \pm 0,6	6,0 \pm 0,1
	1,4,6-Glcp	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
Xylose	t-Xylp	1,1 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
	1,2-Xylp	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
	1,4-Xylp	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1

Tabelle 30: Anteile der glykosidischen Bindungen (mol% \pm Range/2) eines mild säureextrahierten SBP (80 °C; pH 2; 1 h) sowie von zwei autoklavenextrahierten SBP (121 °C; pH 4,6; 20 bzw. 60 min), bestimmt mittels Methylierungsanalyse. Ara: Arabinose, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, SBP: Zuckerrübenpektin (*sugar beet pectin*), t: terminal, Xyl: Xylose

Glykosidische Bindungstypen	pH 2			
	60 min	20 min	60 min	
Arabinose	t-Araf	30,3 \pm 0,5	31,0 \pm 1,0	29,2 \pm 0,9
	t-Arap	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1
	1,2-Araf	0,9 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
	1,3-Araf	1,7 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1
	1,5-Araf	22,6 \pm 0,1	24,5 \pm 0,4	22,2 \pm 0,3
	1,3,5-Araf	16,4 \pm 0,1	20,6 \pm 0,4	17,6 \pm 0,3
	1,2,5-Araf	1,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1
	1,2,3,5-Araf	3,8 \pm 0,1	4,2 \pm 0,4	3,6 \pm 0,1
Galactose	t-Galp	3,4 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	3,6 \pm 0,3
	1,3-Galp	1,5 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
	1,4-Galp	4,1 \pm 0,3	2,5 \pm 0,1	3,9 \pm 0,2
	1,6-Galp	2,4 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1
	1,2,4-Galp	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
	1,3,4-Galp	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1
	1,3,6-Galp	2,0 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1
Rhamnose	1,2-Rhap	1,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
	1,2,4-Rhap	2,1 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	1,9 \pm 0,1
Glucose	t-Glcp	0,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
	1,4-Glcp	2,4 \pm 0,1	1,5 \pm 0,4	4,4 \pm 0,4
	1,4,6-Glcp	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
Xylose	t-Xylp	1,1 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
	1,2-Xylp	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
	1,4-Xylp	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1

Tabelle 31: Hauptextraktionsparameter und Pektinausbeuten (n = 2, ± Range/2) der 43 Zuckerrübenpektine (sugar beet pectin, SBP), die zur Aufstellung der Struktur-Eigenschaftskorrelationen herangezogen wurden. Alle Extraktionen wurden bei 80 °C durchgeführt. Die mit Enzymunterstützung extrahierten Proben (Nr. 33 - 43) wurden durch eine sich an die Säureextraktion anschließende Inkubation mit verschiedenen Cellulase/Hemicellulase-Präparationen und unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (pH, Zeit) gewonnen. CS: Citronensäure, S/L: Feststoff-zu-Flüssigkeitsverhältnis, IPA: Isopropanol

SBP Nr.	pH	Zeit / h	S/L / g/mL	Zusatz CS	Enzymunterstützung	IPA-zu-Extrakt-Verhältnis	Ausbeute / %
1	2	1	1/10	-	-	2,2	13,6*
2	2	1	1/10	-	-	2,2	14,4*
3	2	1	1/10	10 mM	-	2,2	15,2 ± 0,7
4	2	1	1/10	-	-	2,2	11,6 ± 0,2
5	2	1	1/10	-	-	2,2	15,6 ± 0,4
6	2	1	1/10	-	-	4,0	13,4 ± 0,1
7	2	1	1/10	-	-	2,2	10,8 ± 0,2
8	2	1	1/10	50 mM	-	2,2	14,3 ± 0,1
9	2	1	1/10	100 mM	-	2,2	14,6 ± 0,5
10	2	1	1/20	-	-	2,2	12,2 ± 0,5
11	2	1	1/20	-	-	2,2	12,7 ± 0,2
12	2	1	1/10	10 mM	-	2,2	11,0 ± 0,1
13	2	1	1/10	10 mM	-	2,2	11,6 ± 0,2
14	2	1,5	1/10	-	-	2,2	17,7 ± 1,5
15	2	2	1/10	10 mM	-	2,2	16,8 ± 0,1
16	2	2	1/10	-	-	2,2	13,7 ± 0,2
17	2	2	1/10	-	-	2,2	18,3 ± 0,3
18	3	2	1/10	-	-	2,2	5,9 ± 0,1
19	2	4	1/10	-	-	2,2	16,2 ± 0,1
20	2	4	1/10	-	-	2,2	20,1 ± 0,2
21	2	4	1/10	10 mM	-	2,2	17,0 ± 0,2
22	3	4	1/10	-	-	2,2	8,3 ± 1,6
23	2	6	1/10	-	-	2,2	16,8 ± 0,5
24	2	16	1/10	100 mM	-	2,2	24,3 ± 0,2
25	2	16	1/10	100 mM	-	0,7	13,8*
26	2	16	1/10	100 mM	-	4,0	7,6*
27	2	16	1/10	100 mM	-	1,2	20,8*
28	2	16	1/10	-	-	2,2	19,4 ± 0,1
29	2	16	1/10	-	-	2,2	22,2 ± 0,2
30	2	16	1/10	10 mM	-	2,2	18,5 ± 0,3
31	2	16	1/15	10 mM	-	2,2	14,2 ± 1,3
32	3	16	1/10	100 mM	-	2,2	21,9 ± 0,4
33	3	16	1/10	-	+	2,2	14,1 ± 1,0
34	4	16	1/10	100 mM	+	2,2	17,6 ± 1,0
35	2	1	1/10	-	+	2,2	25,6 ± 0,2
36	2	1	1/17	-	+	2,2	16,3 ± 0,5
37	2	1	1/17	-	+	2,2	22,7 ± 0,7
38	2	1	1/17	-	+	2,2	20,0 ± 0,5
39	2	1	1/17	-	+	2,2	14,9*
40	2	1	1/17	-	+	2,2	19,1*
41	2	1	1/17	-	+	2,2	16,6*
42	2	1	1/17	-	+	2,2	19,2*
43	2	1	1/17	-	+	2,2	16,7*

*Einfachbestimmungen

Tabelle 32: Strukturparameter und $x_{90,3}$ -Werte der 43 Zuckerrübenpektine (*sugar beet pectin*, SBP), die zur Aufstellung der Struktur-Eigenschaftskorrelationen herangezogen wurden. Das Molekulargewicht (Gewichtsmittel, M_w), die Monosaccharidzusammensetzungen (Anteile an Rha, Ara, Gal und GalA) und die $x_{90,3}$ -Werte wurden in Dreifachbestimmung analysiert. Der Proteingehalt (Prot.), der *trans*-Ferulasäuregehalt (*t*-FA), der Methylierungsgrad (DM) und der Acetylierungsgrad (DAc) wurden in Doppelbestimmung analysiert. Die Range/2 bzw. Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben. Rha: Rhamnose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure

SBP Nr.	Prot. / %	M_w / kDa	<i>t</i> -FA / mg/100 g	Rha / mol%	Ara / mol%	Gal / mol%	GalA / mol%	DM / %	DAc / %	$x_{90,3}$ / μm
1	3,2	465	770	7,4	49,4	15,9	23,1	64,9	42,4	0,80
2	4,6	470	790	8,5	43,7	18,0	26,4	74,1	49,0	0,80
3	5,2	648	874	5,8	41,1	20,0	28,1	65,5	49,5	0,77
4	5,3	647	684	7,4	45,7	15,9	29,2	65,3	44,7	0,69
5	6,0	913	676	7,4	41,7	21,9	24,4	70,6	46,2	0,81
6	5,2	706	903	7,0	40,1	19,2	31,8	60,5	42,3	0,83
7	5,3	823	843	7,6	41,2	20,4	27,9	65,8	46,3	0,80
8	5,5	903	740	10,4	34,0	24,5	29,2	56,2	37,0	0,91
9	5,6	904	747	10,9	33,1	25,3	28,9	53,7	36,9	0,88
10	5,0	1001	741	9,8	41,1	23,1	24,5	69,4	46,1	0,86
11	5,0	921	689	9,8	40,9	23,0	25,0	62,6	41,7	0,87
12	4,8	810	813	7,1	44,1	19,2	27,0	68,2	47,3	0,81
13	5,0	624	873	7,4	43,6	18,7	28,1	56,5	39,7	0,80
14	5,8	876	747	9,2	36,3	24,1	27,5	75,7	50,3	0,93
15	6,2	811	863	8,0	28,5	22,1	35,5	54,8	38,1	0,90
16	5,5	513	834	6,8	41,4	19,1	28,7	63,4	43,8	0,74
17	6,6	824	682	10,9	27,5	28	27,9	62,1	38,4	0,97
18	3,5	196	509	5,6	47,4	18,3	26,2	62,7	38,1	0,70
19	6,8	819	834	12,6	25,6	26,2	32,0	63,7	41,0	0,97
20	6,6	695	668	13,0	17,8	30,0	32,7	59,8	33,5	1,03
21	6,2	450	714	12,8	19,0	25,9	35,7	55,8	33,2	1,11
22	3,6	388	679	7,6	42,8	22,0	26,3	61,6	42,1	0,84
23	7,1	809	814	11,6	19,0	23,8	41,7	62,1	37,3	1,00
24	6,7	154	635	13,6	8,1	31,0	41,9	54,8	20,7	1,16
25	8,2	205	564	14,6	7,7	25,6	44,8	47,0	16,7	1,18
26	6,0	164	655	14,2	9,3	39,7	31,7	47,5	21,6	1,13
27	7,6	200	643	14,4	8,9	29,6	41,0	60,6	21,7	1,19
28	6,3	459	729	15,8	9,7	22,8	48,7	55,9	24,6	1,05
29	6,8	285	567	15,0	6,5	28,0	43,8	56,4	16,0	1,09
30	7,5	460	737	15,5	10,9	21,0	49,1	59,9	24,8	1,08
31	6,6	241	685	9,0	11,6	22,6	49,1	58,9	29,6	1,01
32	5,0	223	661	9,3	27,6	25,0	33,3	65,0	40,5	0,89
33	4,6	505	750	13,5	27,9	24,8	30,8	58,5	38,0	0,86
34	3,7	419	691	6,8	48,0	17,8	22,9	59,6	38,8	0,76
35	5,4	1225	788	12,5	33,2	20,9	28,1	65,6	49,9	0,86
36	3,3	751	688	7,9	41,0	17,2	30,6	69,1	47,8	0,74
37	3,4	911	772	8,8	42,7	18,0	26,8	61,2	46,2	0,71
38	2,3	880	743	8,2	41,5	17,6	29,4	70,5	52,0	0,72
39	3,7	615	627	7,3	39,2	21,4	28,3	69,9	48,0	0,73
40	2,8	543	734	8,3	39,0	20,5	27,9	70,4	46,7	0,73
41	4,6	532	719	7,3	42,9	19,2	26,5	64,2	44,5	0,75
42	3,1	434	678	7,8	37,6	20,5	31,0	75,1	48,7	0,80
43	4,4	645	752	7,8	39,3	21,2	28,5	64,6	43,7	0,72

Tabelle 33: Anteile der glykosidischen Bindungen (mol% \pm Range/2) der enzymatisch mit *endo*- α -1,5-L-Arabinanase (AA10: 10 U/g; AA40: 40 U/g) bzw. α -L-Arabinofuranosidase (AF10: 10 U/g; AF40: 40 U/g) modifizierten Zuckerrübenpektins, bestimmt mittels Methylierungsanalyse (n = 2). Das Ausgangspektin wurde durch milde Säureextraktion (80 °C; pH 2; 1 h) gewonnen. Der enzymatische Verdau erfolgte bei pH 4 und 40 °C für 24 h. Die Kontrollprobe (KP) wurde ohne Enzymzugabe unter ansonsten identischen Bedingungen bearbeitet. AA: *endo*- α -1,5-L-Arabinanase, AF: α -L-Arabinofuranosidase, Ara: Arabinose, f: Furanose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, p: Pyranose, Rha: Rhamnose, t: terminal, Xyl: Xylose

Glykosidische Bindungstypen		Arabinanverdau Zuckerrübenpektin				
		Kontrolle	AA10	AA40	AF10	AF40
Arabinose	t-Araf	28,0 \pm 0,1	26,4 \pm 0,5	24,6 \pm 0,2	8,7 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1
	t-Arap	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
	1,2-Araf	0,7 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
	1,3-Araf	1,8 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2
	1,5-Araf	22,5 \pm 0,1	15,5 \pm 0,1	13,3 \pm 0,2	29,7 \pm 0,7	9,8 \pm 0,6
	1,3,5-Araf	17,3 \pm 0,3	12,0 \pm 0,2	8,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
	1,2,5-Araf	1,8 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
	1,2,3,5-Araf	3,6 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,3	0,1 \pm 0,1
Galactose	t-Galp	4,0 \pm 0,2	6,7 \pm 0,3	8,4 \pm 0,4	10,7 \pm 0,6	17,3 \pm 0,3
	1,3-Galp	1,6 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1
	1,4-Galp	4,6 \pm 0,1	7,1 \pm 0,2	9,3 \pm 0,1	10,1 \pm 0,1	15,8 \pm 0,3
	1,6-Galp	2,6 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	7,0 \pm 0,2	11,3 \pm 0,2
	1,2,4-Galp	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
	1,3,4-Galp	0,4 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1
	1,3,6-Galp	2,5 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	2,6 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1
Rhamnose	1,2-Rhap	2,1 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	3,9 \pm 0,3	4,9 \pm 0,4	7,8 \pm 0,5
	1,2,4-Rhap	2,5 \pm 0,2	4,0 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1	6,0 \pm 0,4	9,5 \pm 0,1
Glucose	t-Glcp	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
	1,3-Glcp	0,1 \pm 0,1	n.q.	n.q.	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
	1,4-Glcp	1,9 \pm 0,1	7,1 \pm 0,2	9,3 \pm 0,1	6,9 \pm 3,0	5,1 \pm 0,5
	1,4,6-Glcp	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
Xylose	t-Xylp	0,9 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1
	1,2-Xylp	n.q.	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
	1,4-Xylp	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1

Tabelle 34: Pektinausbeuten (n = 2), Proteingehalte (n = 2) und $x_{90,3}$ -Werte (n = 3) der aus Müller-Thurgau- bzw. Rieslingtrester extrahierten Pektine (\pm Range/2 bzw. Standardabweichung). Die Säureextraktionen wurden bei 80 °C und pH 2 für 1 bzw. 16 h durchgeführt. $x_{90,3}$: 90. Perzentil der Tropfengrößenverteilung

	pH 2 / 80 °C / 1 h		pH 2 / 80 °C / 16 h	
	Müller-Thurgau	Riesling	Müller-Thurgau	Riesling
Ausbeute / %	3,8 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	5,1 \pm 0,1	5,6 \pm 0,1
$x_{90,3}$ / μm	4,7 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1
Proteingehalt / %	3,9 \pm 0,1	3,3 \pm 0,2	2,3 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1

9.2 ABBILDUNGEN

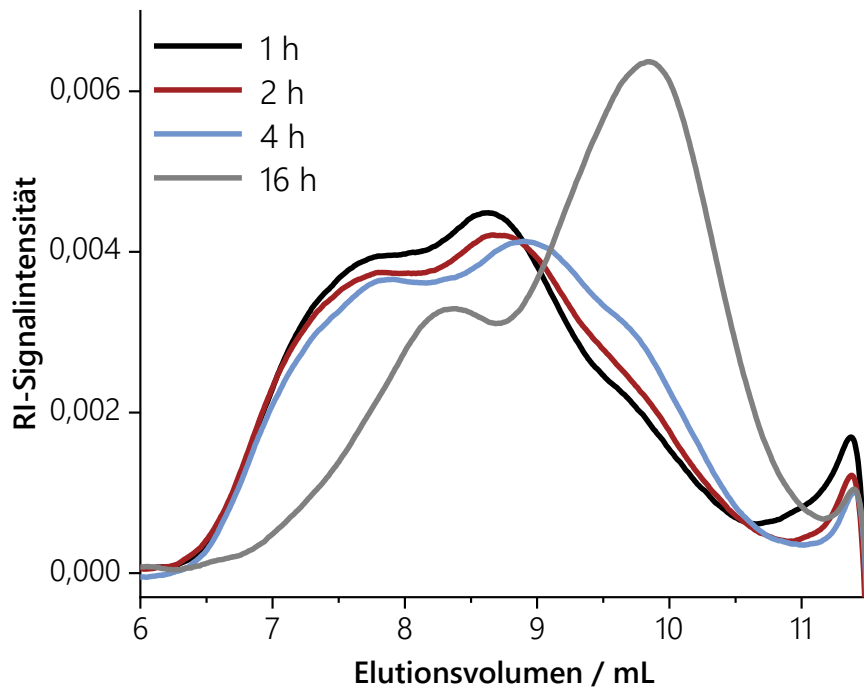


Abbildung 38: Elutionsprofile säureextrahierter Zuckerrübenpektine (pH 2; 80 °C; 1, 2, 4 bzw. 16 h), bestimmt mittels SEC-RI (Größenausschlusschromatographie mit Brechungsindexdetektion). Pektinkonzentration: 2 g/L, Elutionsmittel: 50 mM Natriumnitratlösung (0,5 mL/min), Säule: PW_{XL} G6000 (Tosoh Bioscience, Japan), Temperatur: 50 °C

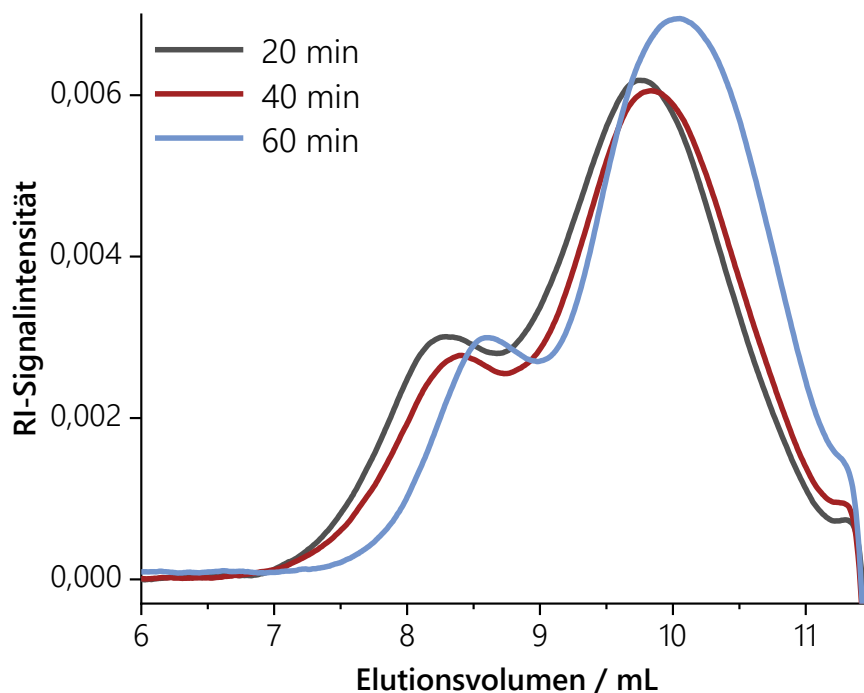


Abbildung 39: Elutionsprofile autoklavenextrahierter Zuckerrübenpektine (pH 4,6; 121 °C; 20, 40 bzw. 60 min), bestimmt mittels SEC-RI (Größenausschlusschromatographie mit Brechungsindexdetektion). Pektinkonzentration: 2 g/L, Elutionsmittel: 50 mM Natriumnitratlösung (0,5 mL/min), Säule: PW_{XL} G6000 (Tosoh Bioscience, Japan), Temperatur: 50 °C

Hauptprodukte

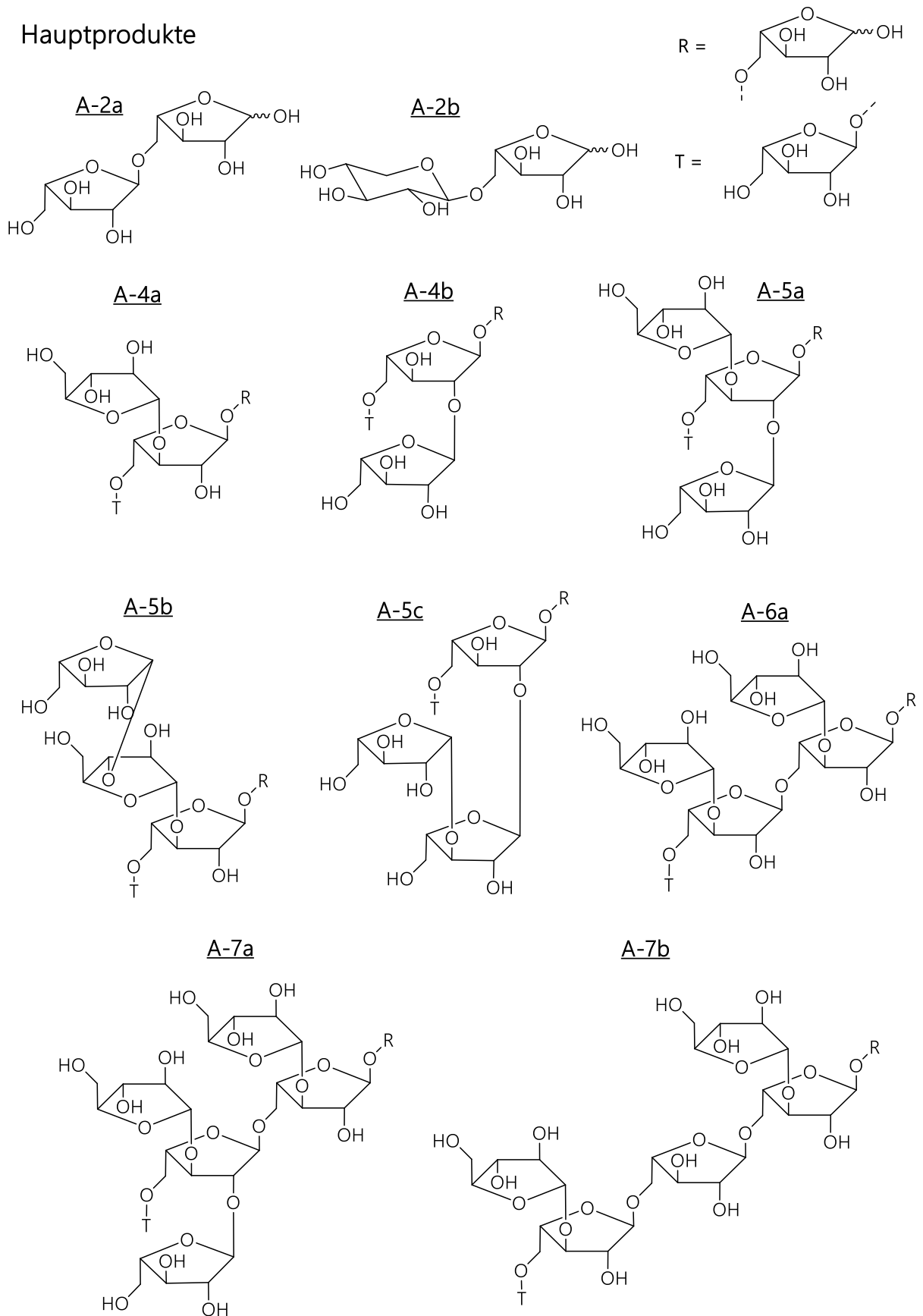


Abbildung 40: Strukturen von Arabinanoligosacchariden, die als Hauptprodukte eines *endo*- α -1,5-L-Arabinanase-Verdau eingeordnet werden (nach Wefers und Bunzel (2016a))

Nebenprodukte

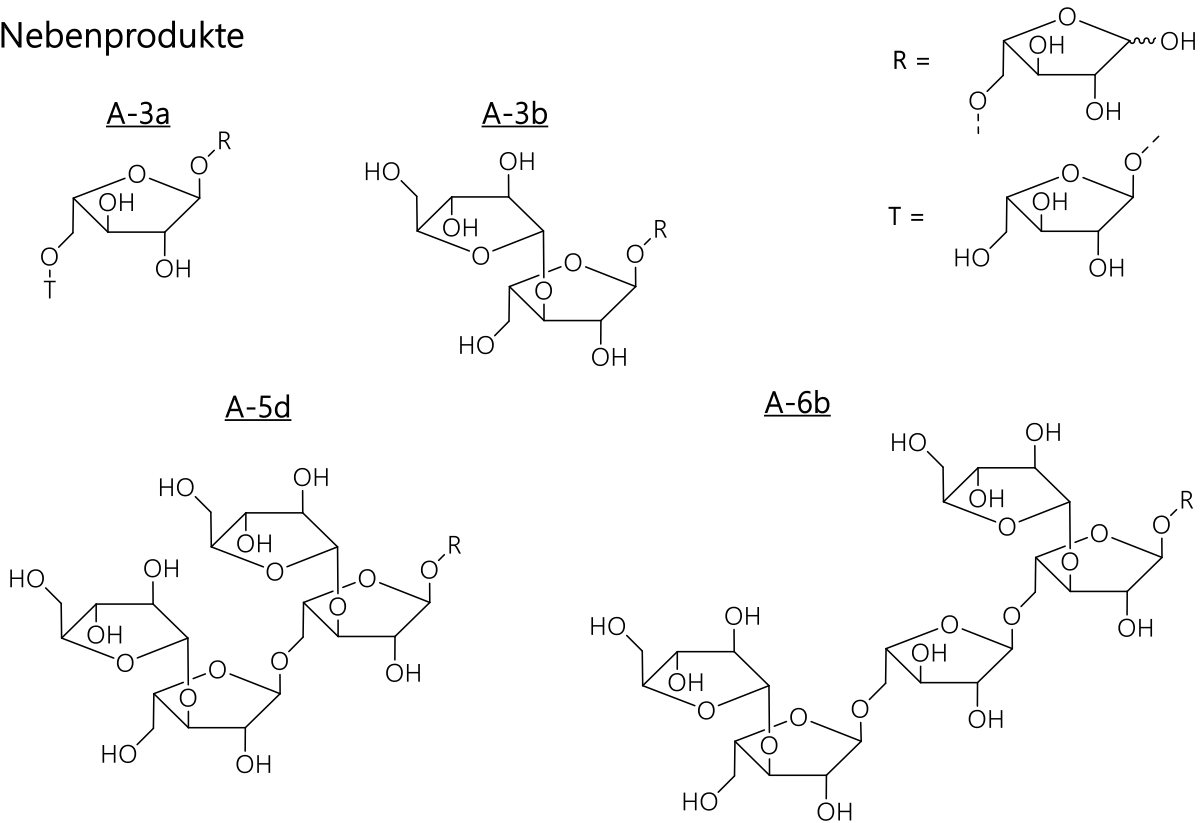


Abbildung 41: Strukturen von Arabinanoligosacchariden, die als Nebenprodukte eines *endo-α*-1,5-L-Arabinanase-Verdau eingordnet werden (nach Wefers und Bunzel (2016a))

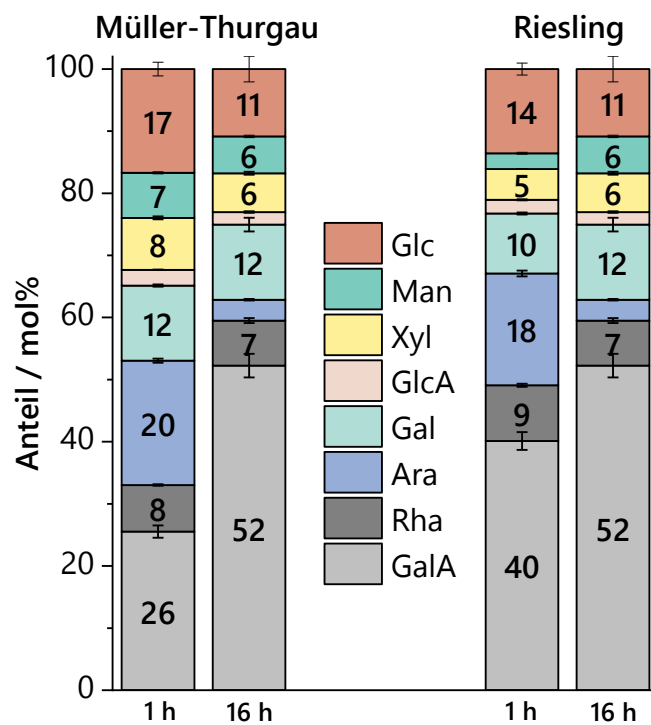


Abbildung 42: Monosaccharidzusammensetzungen der aus Müller-Thurgau- und Rieslingtrester extrahierten Pektine, bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (n = 3). Die Säureextraktionen wurden bei 80 °C und pH 2 für 1 bzw. 16 h durchgeführt. Ara: Arabinose, Gal: Galactose, GalA: Galacturonsäure, Glc: Glucose, GlcA: Glucuronsäure, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose

10 PUBLIKATIONSLISTE

PUBLIKATIONEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

BINDEREIF, B., EICHHÖFER, H., BUNZEL, M., KARBSTEIN, H., WEFERS, D., VAN DER SCHAAF, U. (2021). Arabinan side-chains strongly affect the emulsifying properties of acid-extracted sugar beet pectins. *Food Hydrocolloids* 121, 106968.

STECK, J., JUNKER, F., EICHHÖFER, H., BUNZEL, M. (2022). Chemically different but often mistaken phenolic polymers of food plants: proanthocyanidins and lignin in seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70, 11704 - 11714.

EICHHÖFER, H., BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., BUNZEL, M., VAN DER SCHAAF, U., 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, 2105 - 2112.

VORTRÄGE AUF FACHTAGUNGEN

EICHHÖFER, H., BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., BUNZEL, M., VAN DER SCHAAF, U., WEFERS, D. (2021). Zuckerrübenpektin - Zusammenhänge zwischen Extraktionsparametern, molekularer Struktur und emulgierenden Eigenschaften. *Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, digital.

EICHHÖFER, H., BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., BUNZEL, M., VAN DER SCHAAF, U., WEFERS, D. (2021). Pectins as emulsifiers – targeted extraction and investigation of structure-property relationships. *7th International Congress of the European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE)*, Nantes (Frankreich).

EICHHÖFER, H., BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., BUNZEL, M., VAN DER SCHAAF, U., WEFERS, D. (2023). Auswirkungen spezifischer Strukturmodifikationen auf die Emulgiereigenschaften von säureextrahierten Zuckerrübenpektinen. *Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Karlsruhe.

EICHHÖFER, H., BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., BUNZEL, M., VAN DER SCHAAF, U., WEFERS, D. (2023). Acid-extracted sugar beet pectins: which structural elements are important for emulsion stabilization? *21st Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference*, Thessaloniki (Griechenland).

POSTERBEITRÄGE AUF FACHTAGUNGEN

JUNKER, F., STECK, J., EICHHÖFER, H., BUNZEL, M. (2019). Differenzierung von ballaststoff-assoziiertem Lignin und Proanthocyanidinen am Beispiel von Samen aus Beerenobst. 48. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Dresden.

EICHHÖFER, H., BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., BUNZEL, M., VAN DER SCHAAF, U., WEFERS, D. (2020). Pektinextraktion aus Zuckerrüben - Zusammenhänge zwischen Prozessparametern, molekularer Struktur und emulgierenden Eigenschaften, *LChG "Tweet-your-poster-event 2020"*, digital.

BINDEREIF, B., EICHHÖFER, H., WEFERS, D., BUNZEL, M., KARBSTEIN, H., VAN DER SCHAAF, U. (2021). Proteinreiche Pektine - Wie beeinflusst die Molekülstruktur die resultierende Tropfengröße von Emulsionen? *Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Lebensmittelverfahrenstechnik, Mischvorgänge, Grenzflächenbestimmte Systeme und Prozesse*, digital.

EICHHÖFER, H., BINDEREIF, B., KARBSTEIN, H., BUNZEL, M., VAN DER SCHAAF, U., WEFERS, D. (2021). Pektine als Emulgatoren - Gezielte Extraktion und Untersuchung von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen, 49. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, digital.